

01.10.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

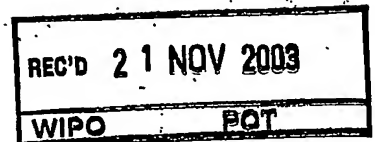
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 0 月    1 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 2 8 8 3 9 4  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 2 8 8 3 9 4 ]

出 願 人            株式会社ダイナベック研究所  
Applicant(s):

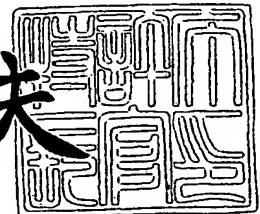


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月    6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 1 5 9 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-A0102

【提出日】 平成14年10月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61P 37/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区千駄木 5 - 1 6 - 1 0

    【氏名】 岩本 愛吉

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区弦巻 1 - 8 - 2 1 - 2 0 8

    【氏名】 立川 愛

【特許出願人】

    【識別番号】 595155107

    【氏名又は名称】 株式会社ダイナベック研究所

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716812

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法であって、

- (a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および
- (b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法。

【請求項 2】 酸処理を行う工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 細胞のTAP活性を阻害する工程が、TAP阻害活性を有する蛋白質を該細胞に接触させる工程または、該蛋白質をコードするベクターを該細胞へ導入する工程である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 TAP阻害活性を有する蛋白質がUS6またはICP47である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 ベクターが哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】 ベクターがセンダイウイルスベクターである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 (i) TAP遺伝子の発現が阻害されているか、TAP阻害剤を含むか、またはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつ (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞。

【請求項 8】 (i) TAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクター、および (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ 、またはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を発現可能なベクター、を含むエピトープを提示させるためのキット。

【発明の詳細な説明】



## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

MHC (major histocompatibility complex) class I分子は重鎖 (heavy chain; HC) と  $\beta 2$ ミクログロブリン ( $\beta 2$ -microglobulin;  $\beta 2m$ ) からなるヘテロダイマーであり、体内にあるほとんどの細胞がその細胞膜表面上に持つ。MHC class I分子はその重鎖によって作られるペプチド収容溝に10アミノ酸前後からなるペプチドを収容することができ、そのMHC class I/ペプチド複合体が細胞性免疫の担い手である細胞傷害性T細胞 (CTL) 上の T cell receptor (TCR) によって認識されることから、MHC class I分子によって提示されるペプチドは「エピトープ (epitope; 抗原決定基)」と呼ばれる。

細胞質内で作られた自己抗原、あるいはウイルス抗原、腫瘍抗原などに由来するペプチド断片は TAP (transporter associated with antigen processing) と呼ばれる粗面小胞体上にあるトランスポーターを介して粗面小胞体へと運ばれ、そこでMHC class I重鎖および  $\beta 2m$ とともに安定なMHC class I/ペプチド複合体を形成する。 $\beta 2$ -ミクログロブリン分子はMHC class Iの立体構造の安定性の確保とH鎖の細胞表面への輸送に役割を果たしている (日本分子生物学会編「免疫系: 認識・分化・増殖」本庶 佑、渡邊 武 編集、丸善株式会社、117-118ページ (非特許文献1))。ペプチドを結合していない空のMHC class I分子は37℃の培養条件では非常に不安定であることが知られている。

## 【0003】

MHC class I分子によって提示されるペプチドであるエピトープは、ある抗原に対する特異的な細胞性免疫を誘導するのに非常に重要な分子であり、HIVをはじめとするウイルス感染や、癌に対する免疫治療としてペプチドワクチンの開発が試みられている。しかしながら多くのウイルス抗原や腫瘍抗原由来の主要なエピトープは、MHC class I分子とペプチドとの結合は弱く、ペプチドのみをワク

チンとして使用してもその安定性の低さから一般に効果が期待できない。これまでに抗原性を損なわずMHC class I分子との結合を高めるアミノ酸置換を行った人工のエピトープを用いた、メラノーマ患者に対する臨床研究では効果が認められているが、このような安定性、抗原性に優れたエピトープを同定、開発することは煩雑で困難であり、必ずしも目的のものが得られるわけではない。

また一方で $\beta 2m$ によるMHC class I分子上のペプチドの安定性の増加という現象が知られており、その $\beta 2m$ のアジュバント効果を利用した系の開発も行われている。

#### 【0004】

近年、エピトープペプチドをMHC class I およびII分子あるいは $\beta 2m$ に融合させたMHC class I/ペプチド複合体の発現が試みられている (Uger, R. A. and Barber, B. H., 1998, J. Immunol. 160: 1598-1605 (非特許文献2); White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676 (非特許文献3); Kang, X. et al., 1997, Cancer Res. 57: 202-205 (非特許文献4); Uger, R. A. et al., J. Immunol. 1999, 162: 6024-6028 (非特許文献5); 米国特許第5,869,270号 (特許文献1))。これらの系では、 $\beta 2m$ のN末端にリンカーを介してエピトープのペプチド配列を融合させること (エピトープ結合 $\beta 2m$ ; epitope-linked- $\beta 2m$ ) (" $e/\beta 2m$ "とも表記する) によって、特にMHC class I分子との結合力の弱いエピトープに関してペプチド単独に比して安定性が増加しCTLによる認識も高まることが報告されている。

#### 【0005】

現在ヒトのMHC class I分子について用いられているMHC class I/ペプチド複合体は、大腸菌にて重鎖(HC)および $\beta 2m$ 蛋白質を別々に発現させ、精製し、さらに合成ペプチドを用いた3者によるインビトロフォールディングにてMHC class I/ペプチド複合体を作製している。それに対してマウスのMHC class I分子についてバキュロウイルスベクターを用い、昆虫細胞由来のMHC class I/ペプチド複合体の作製が報告されている (White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676 (非特許文献3))。この系ではMHC class I重鎖、エピトープ結合 $\beta 2m$ を各々発現するバキュロウイルスを重感染させることによって、その細胞内でMHC

class I/ペプチド複合体が作られる。バキュロウイルスベクターは昆虫細胞（例えばSf9細胞）で有効なプロモーターの下流で外来遺伝子を発現するシステム（特表平6-502990（特許文献2））であるため、哺乳類由来の細胞を利用することは困難である。また、PunnonenらはDNAシャッフリングに用いる遺伝子ワクチンベクターを開示しているが、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ については記載されていない（Punnonen, J. 他、Genetic Vaccine Vector Engineering、米国特許出願第20010006950号（特許文献3））。

#### 【0006】

##### 【特許文献1】

米国特許第5,869,270号

##### 【特許文献2】

特表平6-502990号

##### 【特許文献3】

米国特許出願第20010006950号

##### 【非特許文献1】

本庶 佑、渡邊 武 編集、「免疫系：認識・分化・増殖」，日本分子生物学会編，丸善株式会社，117-118

##### 【非特許文献2】

Uger, R. A. and Barber, B. H., 1998, J. Immunol. 160: 1598-1605

##### 【非特許文献3】

White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676

##### 【非特許文献4】

Kang, X. et al., 1997, Cancer Res. 57: 202-205

##### 【非特許文献5】

Uger, R. A. et al., J. Immunol. 1999, 162: 6024-6028

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、TAP活性の阻害により MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法を提供することを課題とする。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、遺伝子組み換えによりエピトープを結合した $\beta 2m$ をコードする遺伝子を構築し、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いてこのエピトープ結合 $\beta 2m$ を哺乳動物細胞で発現させて、これらの細胞においてMHC class I/ペプチド複合体を生産させる系の開発を行った。しかし、哺乳動物の細胞表面には多数のMHC class I分子が存在しており、それぞれのMHC class I分子は細胞内に存在するタンパク質由来の様々なペプチドを提示しているため、エピトープ結合 $\beta 2m$ を哺乳動物細胞で発現させた場合、このエピトープ結合 $\beta 2m$ と複合体を形成するMHC class I分子の割合はその分低下してしまう。

## 【0009】

本発明者らは、目的のエピトープを提示したMHC class I分子の頻度を高めることは、免疫誘導にとって極めて重要だと考えた。例えば、MHC class I/ペプチド複合体を用いた抗原特異的CTLの頻度の定量において、“MHC class I/ペプチド・テトラメリック複合体（テトラマー）” [MHC class I/peptide tetrameric complex (tetramer)] を用いる方法が開発されている (Altman J. D. et al., Science 274: 94-96 (1996))。これはMHC class I/ペプチド複合体をbiotin-avidinの結合を用いて4量体化し、さらに蛍光標識を付加したもので、FACSによる解析に利用される。この方法は個体から分離した末梢血単核球をそのまま用いて測定することができるため、簡便で個体内の頻度を直接反映する上、非常に感度がよく、さらに特異性も高いことが確認されている (Wilson, J. D. K. et al., J. Exp. Med. 188: 785-790 (1998); Kuroda, M. J. et al., J. Exp. Med. 187: 1373-1381 (1998))。本発明者らは、上記に示したMHC class I/ペプチド複合体の解析においては、当初試みられていた単量体のMHC class I/ペプチド複合体では1:1のMHC class I/ペプチド複合体とTCRの結合力が弱いためFACSによる解析が不可能であったが、それをテトラマーにすること、つまり複数のMHC class I/ペプチド複合体 - TCRの結合が同時に存在することによってはじめて解析が可能になったという経緯に注目した。

## 【0010】

また、上記のエピトープ結合  $\beta 2m$  を哺乳動物細胞で発現させる系においても、細胞内に存在するタンパク質由来の様々なペプチドを提示させたままにしておくことにより、目的のエピトープを提示している MHC class I/ペプチド複合体が近傍に存在する確率が低下する可能性がある。

#### 【0011】

以上の二つの点を考えあわせることで、本発明者らは、一つの細胞膜上の MHC class I/ペプチド複合体上に同じエピトープを高率に提示させることができれば、TCR による認識もより効率よく行われる、すなわち CTL を効率良く活性化できると考えた。例えば、これまでに細胞表面を酸処理することによって、提示されている MHC class I/ペプチド複合体上のペプチドをはがし、洗い流した後に単一の合成ペプチドを高濃度に加えると CTL を効率良く活性化できるという報告がある (Langlade-Demoyen, P. et al., 1994, Int. Immunol. 6: 1759-1766)。しかしながらこのような操作は試験管内では可能であるが、実際の個体内では不可能であり、かつ上記のようにペプチドの安定性は低いことを考えると免疫治療への応用は難しい。

#### 【0012】

そこで本発明者らは、TAP を介したペプチド輸送を阻害する分子を用いて細胞由来の抗原提示を阻害し、 $\beta 2m$  に融合した目的のエピトープのみを抗原提示させようと考えた。まず、TAP 阻害因子として知られる単純ヘルペス I 型ウイルス (HSV-1) 由来の ICP47 (Hill, A. et al., 1995, Nature 375: 411-415; Fruh, K. et al., 1995, Nature 375: 415-418) およびヒトサイトメガロウイルス (CMV) の US6 (Ahn, K. et al., 1997, Immunity 6: 613-621; Hengel, H. et al., 1997, Immunity 6: 623-632) を発現する組み換えセンドライウイルス (SeV) ベクターを構築した。このベクターを、ヒト CD4 陽性 T リンパ球株 H9、および MT-2 に導入し、フローサイトメトリーにより細胞表面上の MHC class I/ペプチド複合体を解析した。その結果、対照の野生型 SeV を感染させた細胞では MHC class I/ペプチド複合体レベルに有意な変化は検出されなかったが、TAP 阻害分子 US6 を発現する SeV ベクターを感染させた細胞では、時間と共に MHC class I/ペプチド複合体レベルが減少し、新規 (de novo) の MHC class I/ペプチド複合体の発現が抑

制されていることが示された。

#### 【0013】

次に、ICP47またはUS6を発現するSeVベクターを上記細胞に感染後、さらに酸処理を行って細胞表面上に発現するエピトープを解離させた。この処理により、細胞表面上にもともと存在するMHC class I/ペプチド複合体をより効率的に減少させることが可能であった。さらに本発明者らは、エピトープ結合 $\beta 2m$ と同時にTAP阻害分子を細胞内に発現させることによって、細胞表面上の単一エピトープを持つMHC class I/ペプチド複合体の高率な発現を試みた。そのために本発明者らは、TAP阻害分子(US6)とエピトープ結合 $\beta 2m$ を共発現するベクターを構築した。ベクターから発現されるエピトープは $\beta 2m$ と融合しているため、TAPとは無関係に粗面小胞体内に存在することができる。このベクターを用い、TAP阻害因子の効果により内在性蛋白質由来のペプチドを提示するMHC class I/ペプチド複合体を減少させ、目的の外来エピトープが結合した $\beta 2m$ を含むMHC class I/ペプチド複合体を高頻度で発現させることに成功した。このように、「細胞表面上の単一ペプチドを持つMHC class I/ペプチド複合体の高率な発現」に関してTAP阻害分子を用いた系は本発明により初めて提供されたまったく新しい概念であり、免疫治療ワクチンとして期待が持たれる。

#### 【0014】

本発明により、目的のエピトープ結合 $\beta 2m$ を含むMHC class I/ペプチド複合体を、哺乳動物細胞において高い純度で発現させることが可能となる。例えば、実施例に示すようなエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I重鎖を発現する哺乳動物細胞感染性のウイルスベクターを細胞に導入し、TAP阻害剤存在下で発現させることにより、導入遺伝子から発現されるエピトープを含むMHC class I/ペプチド複合体を優先的に細胞表面に形成させることができる。

#### 【0015】

実施例に示すように、エピトープ結合 $\beta 2m$ (HIV-1 Nefタンパク由来のエピトープが結合している $\beta 2m$ )とMHC class I重鎖(HLA-A\*2402)とを共発現させた細胞は、HIV-1 Nefタンパク由来の合成エピトープペプチドをパルス投与した場合と同等またはそれ以上の効率で抗原特異的CTLに認識される。また、エピトー

プ結合  $\beta 2m$ を発現するSeVベクター導入細胞から回収したエピトープ結合  $\beta 2m$ は、エピトープ結合  $\beta 2m$ を標的細胞の培養液に添加することによって、標的細胞に対する抗原特異的CTLの反応を誘導する。これらの知見は、エピトープ結合  $\beta 2m$ をコードするベクターが、抗原特異的な免疫反応を誘導するためのインビボまたはエクスピボにおける遺伝子治療に有用であることを示している。ここにTAP阻害剤を用いることにより、さらに高純度で目的のエピトープを提示させることが可能となる。TAP阻害蛋白質の存在下で目的のMHC class I/ペプチド複合体を個体内で産生させれば、極めて効果の高い免疫治療を実現することが可能と考えられる。

#### 【0016】

このように本発明者らは、TAPの阻害を介して内因性のエピトープの提示を阻害することによって、効率的に外来エピトープを提示させる方法確立した。TAP阻害剤の存在下でエピトープを融合させたMHC class I 重鎖または  $\beta 2m$ を発現するベクターをインビボおよびエクスピボで導入することにより、抗原特異的細胞性免疫を誘導することが可能になる。本発明の方法は、例えばウイルスやバクテリア等の感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などに有用である。

#### 【0017】

本発明は、TAP活性を阻害することにより MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法に関し、より具体的には、

- (1) MHC class Iによる外来エピトープの提示を増強する方法であって、
  - (a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および
  - (b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた  $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法、
- (2) 酸処理を行う工程をさらに含む、(1)に記載の方法、
- (3) 細胞のTAP活性を阻害する工程が、TAP阻害活性を有する蛋白質を該細胞に接触させる工程または、該蛋白質をコードするベクターを該細胞へ導入する工程である、(1)または(2)に記載の方法、
- (4) TAP阻害活性を有する蛋白質がUS6またはICP47である、(3)に記載の方

法、

(5) ベクターが哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターである、(3)に記載の方法、

(6) ベクターがセンダイウイルスベクターである、(5)に記載の方法、

(7) (i) TAP遺伝子の発現が阻害されているか、TAP阻害剤を含むか、またはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつ(ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞、

(8) (i) TAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクター、および(ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ 、またはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を発現可能なベクター、を含むエピトープを提示させるためのキット、に関する。

【0018】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、TAP活性を阻害することにより MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法を提供する。本発明の方法は、具体的には、(a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および(b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法である。工程(a)および(b)の順序に制限はなく、上記方法には、(a)または(b)のどちらを先に行った場合でも、また同時に行った場合も含まれる。TAPとは、ATP結合カセットファミリーに属する分子で、TAP-1およびTAP-2の2種類がある。双方とも膜貫通ドメインを持ち、小胞体膜上でヘテロダイマーを形成してトランスポーターの機能を発揮する。この2つのどちらが欠けてもMHC class I分子による抗原提示はできなくなる。細胞質内でプロセッシングを受けたペプチドはTAPトランスポーターによってATP依存性に小胞体内へと輸送され、そこでMHC class I分子と結合する。本発明においてTAPには、TAP-1およびTAP-2が含まれる。またTAP活性の阻害は、TAP-1および/またはTAP-2の活性の阻害が含まれる。TAP活性の阻害は、直接または間接であってよい。例えば、TAP活性の阻害には、TAPに直接作用する阻害



剤を適用してTAPの活性を阻害すること、およびTAPの発現（転写または翻訳）の抑制により間接的にTAP活性を阻害することが含まれる。TAPの発現の阻害は、TAP遺伝子のアンチセンス核酸を細胞で発現させたり、あるいはTAP遺伝子の転写産物を切断するリボザイムを細胞で発現させることにより実施することができる。またTAP活性を阻害するには、TAP遺伝子に変異を導入したり、あるいはターゲティングによりTAP遺伝子を欠失させてもよい。本発明において「TAP活性を阻害する工程」は、TAP遺伝子の発現が欠損した細胞を提供または準備する工程であってもよい。本発明においてTAP阻害剤にはTAPの活性を直接または間接に阻害する化合物が含まれ、このようなアンチセンス核酸およびリボザイム、さらにTAP遺伝子の発現を抑制する因子などもTAP阻害剤に含まれる。TAP阻害剤としては、TAPを阻害する活性を有する限り制限はなく、タンパク質、ペプチド性化合物、非ペプチド性化合物、核酸、核酸アナログ、低分子化合物などであってよい。

#### 【0019】

TAP阻害剤が核酸によりコードされうる場合は、該核酸を発現するベクターを細胞に導入することによりTAP阻害剤を発現させることができる。例えば、TAP阻害蛋白質としては、特に単純ヘルペスウイルス由来のICP47 (Hill, A. et al., 1995, Nature 375:411-415; Fruh, K. et al., 1995, Nature 375:415-418) およびサイトメガロウイルス由来のUS6 (Ahn, K. et al., 1997, Immunity 6:613-621; Hengel, H. et al., 1997, Immunity 6: 623-632) などが挙げられる。ICP47分子はTAP分子のペプチド結合部位と結合することによってTAPによるペプチドの輸送を阻害する (Tomazin, R. et al., 1996, EMBO J. 15:3256-3266)。一方、US6分子はTAP1へのATPの結合を阻害し、その結果ペプチドの輸送を阻害している (Hewitt, E. et al., 2001, EMBO J. 20:387-396)。これらのいずれの分子も、本発明においてTAP活性を阻害するために用いることができる。これらの蛋白質は、野生型蛋白質に限らず、TAPを阻害する活性を有する限り、野生型から改変された蛋白質なども含まれる。例えば、TAP阻害活性を持つ部分ペプチドであってもよい。発現ベクターは所望のベクターを用いることができるが、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが好ましい。ベクターは、TAP阻害剤の他に、後述のエピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を共発現するように構

築することが可能である。

#### 【0020】

TAP活性の阻害は一過的であってもよいが、好ましくは持続的に阻害する。例えば、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程において、外来エピトープが有意に提示されるのに十分な期間、TAP活性が阻害されていることが好ましい。

#### 【0021】

外来エピトープの提示を増強する本発明の方法においては、TAP活性を阻害する工程に加え酸処理を行う工程を含むことがより好ましい。酸処理を行う順序は制限されない。TAP活性を阻害する工程、またはエピトープ融合蛋白質を細胞で発現させる工程の前後または同時に行えばよい。例えば、発現ベクターを用いてTAP阻害因子とエピトープ融合蛋白質とを共発現させる場合に酸処理を行う方法の1つを具体的に挙げれば、(i) TAP阻害蛋白質、およびエピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を細胞で発現させる工程に続き、(ii) 該細胞に酸処理を行う工程、を行う方法である。TAP活性を阻害する工程により、内因的な抗原プロセッシングの過程が遮断される一方、酸処理により既に細胞表面に提示されているエピトープペプチドを解離させることができる。酸処理とは、細胞表面に提示されているエピトープペプチドが有意に解離するような酸性環境に細胞を暴露することを言う。酸処理は、例えば細胞を4℃の peptide stripping buffer (0.13M citric acid (pH3), 66mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150mM NaCl, 17  $\mu\text{g/ml}$  Phenol Red) で1分間処理し、その後十分量の培養液 (例えばRPMI1640) にて中和することにより実施することができる。当業者であれば、これ以外にも同様の効果を示す酸処理を異なるプロトコルで行うことができる。

#### 【0022】

MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ に結合させるエピトープは所望のものを用いることができる。本発明において「エピトープ」とは、免疫細胞により認識され得るペプチドを言う。免疫細胞としては、T細胞、B細胞、NK細胞、またはNKT細胞などが挙げられる。本発明において好ましいエピトープは、T細胞により認識されるペプチドである。エピトープは、抗原提示細胞により提示されたペプチドのみ

ならず、免疫細胞により認識され得る限り所望のペプチドであってよく、例えば、人工的に作製したアミノ酸配列からなるペプチドをエピトープとして用いることもできる。より好ましくは、エピトープは抗原提示細胞 (APC) により提示されたペプチドまたはその部分を含むペプチドである。本発明においてエピトープとなる蛋白質またはペプチドの「部分」は、通常、連続した8アミノ酸以上を含む部分である。好ましくは、連続した9アミノ酸以上、より好ましくは連続した10以上、12以上、または15以上のアミノ酸を含む部分である。また、本発明において細胞内で抗原プロセッシングを経て提示されているエピトープペプチドを、その細胞において内因的に提示されているエピトープと言い、それ以外のエピトープを「外来エピトープ」という。例えば、仮にアミノ酸配列が内因的に提示されたエピトープと同じであっても、細胞外から添加されたり、細胞内の抗原プロセッシングを経ないで提示されているエピトープは本発明において外来エピトープに含まれる。また、MHC class I重鎖または $\beta 2m$ などのMHCを構成する蛋白質に融合蛋白質の形態で共有結合しているエピトープペプチドなどは、本発明において外来エピトープに含まれる。TAP阻害剤を用いる本発明の方法により、細胞内の抗原プロセッシングを阻害し外来エピトープを高頻度で細胞に提示させることができる。

### 【0023】

外来エピトープは、MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ のどちらにでも結合させることができる。本発明において用いられるエピトープに制限はなく、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して治療効果を有する所望のエピトープ等を用いることができる。エピトープは、一般的には8アミノ酸以上、例えば約10アミノ酸のペプチドを用いることが好ましいが、エピトープとするペプチドの長さは適宜変えることができる。 $\beta 2m$ に結合させる場合、エピトープは $\beta 2m$ の所望の部位に結合させてよいが、例えば分泌後の $\beta 2m$ 分子のN末端となるようにエピトープを結合させることが好ましい。このためには、 $\beta 2m$ の分泌シグナル配列に続いてエピトープを結合し、場合によりスペーサー配列を介して、 $\beta 2m$ 蛋白質を連結した融合蛋白質を製造すればよい。あるいは、スペーサーを介さず、エピトープを直接 $\beta 2m$ と連結してもよい。スペーサーのアミノ酸配列に特に制限は

ないが、例えば Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号: 1) からなるアミノ酸配列またはその繰返しである (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> 等を含むペプチドを用いることが好ましい。繰返し回数 (n) に制限はないが、例えば 1~5 (1、2、3、4、または 5) にすることができる。スペーサーを用いる場合、その長さは好ましくは16アミノ酸以内であり、例えば 4アミノ酸、8アミノ酸、または 16アミノ酸等を例示することができる。用いられる  $\beta 2m$  としては特に制限はなく、所望の哺乳動物の  $\beta 2m$  分子を用いることができる。ヒトへの適用のためにはヒト  $\beta 2m$  が好ましい。ヒト  $\beta 2m$  遺伝子は例えば実施例に記載したようにして単離することができる。なお  $\beta 2m$  は野生型蛋白質であってもよく、アミノ酸配列が改変された蛋白質であってもよい。

#### 【0024】

MHC class I 重鎖にエピトープを結合させる場合、エピトープはMHC class I 重鎖の所望の部位に結合させてよいが、例えば分泌後のMHC class I分子のN末端となるようにエピトープを結合させるのが好ましい。このためには、MHC class I重鎖の分泌シグナル配列に続いてエピトープを結合し、場合によりスペーサーを介して、MHC class I重鎖を連結した融合蛋白質を製造すればよい。あるいはスペーサーを介さず、エピトープを直接MHC class I重鎖と連結してもよい。

#### 【0025】

スペーサーのアミノ酸配列に特に制限はないが、例えばGly-Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号: 2) からなるアミノ酸配列またはそのくり返しである (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub> 等を含むペプチドを用いることが好ましい。くり返し回数(n)には制限はないが、例えば1~5にすることができる。マウスMHC class I分子であるH2-Kdを用いた報告では10アミノ酸GGPGGGSGGG (配列番号: 3)、20アミノ酸GGP(GGGGS)<sub>2</sub>GGSGGG (配列番号: 4)、30アミノ酸 GGP(GGGGS)<sub>4</sub>GGSGGG (配列番号: 5) のスペーサー配列を比較した場合、10アミノ酸のスペーサー配列のものがもっとも効果的に認識されている (Mottez, E. et al., 1995, J. Exp. Med. 181: 493-502)。また、ヒトのMHC class IであるHLA-A2分子を用いた報告では10アミノ酸 (GGSGGGASGG) (配列番号: 6) のスペーサー配列を用いて、メラノーマ抗原エピトープを効果的に提示させている (Kang, X. et al., 1997, Cancer Res.

57:202-205)。従って、これらのスパーサー配列を介してエピトープを結合することは好ましい。

#### 【0026】

MHC class I 重鎖としては、その由来に特に制限はないが、ヒトへの適用のためにはヒトのMHC class I分子 (HLA) が好ましい。ヒトのMHC class I分子はヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) と呼ばれ、非常に多様性に富んでいる。本発明において用いるHLAは、これらのいずれの分子でもよい。例えば感染症や癌などにおいて目的のエピトープが判明しているいずれのHLA型にも本発明を適用することが可能であり、オーダーメイド (あるいはテーラーメイド) な試薬または医薬とすることができる。

特に日本においては、HLA-A24 (約6~7割)、HLA-A2 (約4割)、及びHLA-A26 (約2割) などのHLA型の頻度が高く、次いで、HLA-A11 (2割)、-A31 (2割弱)、-A33 (2割弱) の頻度も高い。これらのHLAは、日本人への適用を考えた場合に特に好ましい。

#### 【0027】

ある程度の不特定多数に対応した試薬および医薬の開発のためには、例えば日本であれば、日本人において5%以上のアレル頻度のHLA (すなわち10%以上の日本人が有している) が好ましい。このようなHLA型としては以下のものが挙げられる。

A locus	B locus
A*0201	B*0702
A*0206	B*1501
A*1101	B*3501
A*2601	B*4001
A*31012	B*4002
A*3303	B*44031
	B*4601
	B*52011
	B*5401

## 【0028】

実施例において本発明者らは、MHC class I分子としてA24拘束性HLA class I重鎖を用い、エピトープとしては、A24拘束性HLA class I分子によって提示されるHIV-1由来のエピトープを用いた。HLA-A\*2402という遺伝子型は日本人の約6～7割が持つ。従って、A24拘束性HLA class I重鎖、特にA\*2402 (Litte, A.-M., Immunogenetics 35: 41-45 (1992)) は、日本人への適用を考えた場合に好適である。MHC class I重鎖は野生型蛋白質であってもよく、アミノ酸配列が改変された蛋白質であってもよい。

## 【0029】

エピトープを融合させたMHC class I重鎖または $\beta 2m$ 、あるいはTAP阻害蛋白質は、公知の遺伝子組み換え技術により組み換え蛋白質として調製することができる (J. Sambrook and D. W. Russell eds., "Molecular cloning: a laboratory manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)。組み換え蛋白質の発現に用いる発現ベクターに制限はなく、プラスミドベクターやウイルスベクターなど所望の発現系を用いればよい。組み換え蛋白質産生のための発現ベクター-宿主細胞系は様々なものが知られており、宿主細胞としては、例えばバクテリア、酵母、動物細胞、および植物細胞など所望の細胞を用いることができる。発現された組み換え蛋白質は、公知の蛋白質精製方法により実質的に純粋になるように精製することができる。本発明において好ましい態様においては、エピトープを融合させたMHC class I重鎖または $\beta 2m$ は哺乳動物細胞において発現される。これにより、大腸菌などで発現させる場合に比べ、糖鎖などの修飾が正常に起こり、免疫細胞への抗原提示の効率が高まることが期待される。哺乳動物細胞で発現可能なベクターは、組み換え蛋白質の製造のためのみならず、ベクターを細胞に導入し、標的細胞の細胞表面に外来エピトープを提示させるために用いることもできる。哺乳動物細胞におけるエピトープ融合MHC class I重鎖または $\beta 2m$ 、あるいはTAP阻害蛋白質の発現は、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターの導入により行うことが好適である。

## 【0030】

エピトープ結合 $\beta 2m$ と膜結合型のMHC class I重鎖の両者の遺伝子を導入すれ

ば、細胞表面上に特定のエピトープを提示する大量のMHC class I/ペプチド複合体が発現される。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対し、優れた抗原提示能を有している。

#### 【0031】

すなわち、本発明は以下を提供する。

[1] エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を製造する方法であって、

(a) 細胞のTAP活性を阻害する工程、および

(b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を該細胞で発現させる工程、を含む方法。

[2] 酸処理を行う工程をさらに含む、[1]に記載の方法。

[3] 細胞のTAP活性を阻害する工程が、TAP阻害活性を有する蛋白質を該細胞に接触させる工程または、該蛋白質をコードするベクターを該細胞へ導入する工程である、[1]または[2]に記載の方法。

[4] TAP阻害活性を有する蛋白質がUS6またはICP47である、[3]に記載の方法。

[5] ベクターが哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターである、[3]に記載の方法。

[6] ベクターがセンダイウイルスベクターである、[5]に記載の方法。

[7] [1] から [6] のいずれかに記載の方法により製造された、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を含む組成物。

#### 【0032】

また本発明は、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ を発現する哺乳動物細胞の製造方法に関する。この方法は、具体的には、(a) 哺乳動物細胞のTAP活性を阻害する工程、および (b) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ をコードする遺伝子を該細胞で発現させる工程、を含む。工程 (a) および (b) の順序は限定されない。どちらを先に行ってもよく、また同時に行ってもよい。得られた細胞は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために

有用である。例えば、患者由来の細胞（例えば樹状細胞）にこの方法を用いて目的の外来エピトープを高頻度に発現させ、患者体内において抗原特異的細胞性免疫を誘導することができる。特に、哺乳動物細胞のTAP活性を阻害する工程を、TAP阻害活性を有する蛋白質をコードするベクターを該細胞に導入する工程により実施することが好ましい。これにより、細胞でTAP阻害蛋白質が発現する。このとき、上記の工程（a）および（b）は同時に行う場合、例えばTAP阻害活性を有する蛋白質をコードするベクター、およびエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ をコードするベクターを細胞に共導入すること、また、TAP阻害活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を、エピトープを融合させたMHC class I 重鎖または $\beta 2m$ をコードするベクターに組み込み、同一ベクターから両者の蛋白質を共発現させることも本発明に含まれる。あるいは、TAP遺伝子を欠損させたり、TAP遺伝子の発現を抑制させた細胞に、工程（b）を行ってもよい。この細胞またはその培養上清から、産生されたエピトープを融合させたMHC class I 重鎖またはエピトープを融合させた $\beta 2m$ を回収することができる。TAP遺伝子を欠損した細胞は、例えば公知の遺伝子ターゲティング法に従って作り出すことができる。Cre-loxP系などを利用して、コンディショナルにTAP遺伝子の発現を制御することもできる。本発明は、TAP活性が阻害されており、かつエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞を提供する。また本発明は、TAP阻害剤を含むかまたはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞を提供する。細胞がある遺伝子を発現可能に保持するとは、該細胞においてその遺伝子が発現しているか、または発現を誘導することが可能であるように細胞に含まれていることを言う。例えば、誘導性プロモーターやCre-loxP系などを利用することにより、誘導的にその遺伝子を発現できる細胞などが挙げられる。

### 【0033】

すなわち、本発明は以下を提供する。

<1> (i) TAP活性が阻害されており、かつ (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可



能に保持する哺乳動物細胞。

〈2〉 (i) TAP遺伝子の発現が阻害されているか、TAP阻害剤を含むか、またはTAP阻害剤をコードする遺伝子を発現可能に保持し、かつ (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子を発現可能に保持する哺乳動物細胞。

〈3〉 TAP阻害剤がUS6またはICP47である、〈2〉に記載の方法。

〈4〉 TAP阻害剤をコードする遺伝子、および/またはエピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくはエピトープを融合させた $\beta 2m$ をコードする遺伝子が、哺乳動物細胞に感染可能なウイルスベクターを介して細胞に導入されている、〈1〉から〈3〉のいずれかに記載の方法。

〈5〉 ベクターがセンダイウイルスベクターである、〈4〉に記載の方法。

〈6〉 〈1〉から〈5〉のいずれかに記載の細胞を含む組成物。

#### 【0034】

哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いてTAP阻害蛋白質、および/またはエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I 重鎖を発現させる場合、用いるベクターとしては特に制限はなく、所望のウイルスベクターを用いることができる。本発明において用いられる哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞以外の細胞に感染する能力を有していてもよい。ベクターとしては、宿主に対する毒性が低く、導入遺伝子の高い発現が得られるものが好ましい。本発明において好適なウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、フォウルポックスウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが挙げられるがこれらに制限されない。これらのベクター系を用いて、TAP阻害因子、エピトープ結合MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ 、あるいはTAP阻害因子とエピトープ結合MHC class I 重鎖または $\beta 2m$ とを発現する組み換えウイルスベクター等を構築することができる。なお、本明細書において、「組み換え」ウイルスベクターとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスベクターを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自

然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。より具体的には、例えば人為的にポリヌクレオチド鎖が繋ぎ替えられたり、あるいは新たに生成されたポリヌクレオチドである。「組み換え」ウイルスベクターは、例えば遺伝子操作により構築されたウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるウイルスベクターが含まれる。組み換えウイルスベクターは、例えば、組み換えウイルスcDNAを宿主細胞で発現させ、ウイルス粒子を再構成して生成することができる。

### 【0035】

組み換えウイルスベクターは当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスベクターの作製は、斎藤らの方法（Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社）に従い、例えばアデノウイルス（Ad）5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAd DNAを持つ42KbのコスミドpAdexlcw（鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁）を、適当な制限酵素例えばSwaI等で切断し、ゲル濾過等にて適宜脱塩精製し、外来遺伝子発現ユニットをT4リガーゼ等による連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲル濾過にて脱塩し、SwaIによる切断反応を行う。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断する。その一部についてギガパックXLキット（ストラタジーン社、米国）等によるインビトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入し得られたアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制限酵素消化によりその構造を調べ、外来遺伝子発現ユニットが目的の方向（E1A、E1Bの転写と逆方向）に挿入された組換えコスミドを単離する。一方で、E1及びE3領域を欠くアデノウイルス5型（Ad5 dlX株）のDNA-末端蛋白質複合体（DNA-TPC）を斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により調製する。これを例えば、制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過等により脱塩精製する。該コスミドとEcoT22I消化断片を混合し、セルフエクトキット（ファルマシア社、スウェーデン）等を用いて、293細胞に導入する。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁

し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釈液（293細胞懸濁液にて希釈）を96穴プレートに撒く。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウイルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出す。それを数回凍結融解し、アデノウイルス粒子を細胞から放出させる。その遠心上清液（1次ウイルス液）を、24穴プレートにまいた293細胞に感染させる。3日後に死細胞を含む培養液を取り出し、一部は1次ウイルス液作成の要領で凍結融解し、遠心上清液を得る（2次ウイルス液）。残りの培養液を遠心し、細胞を得る。それよりDNAを調製し、制限酵素切断によって組換えアデノウイルスDNAの構造を検討し、目的の構造が確認されたクローンを選択する。その2次ウイルス液を用いて、より多量の293細胞に感染させ、その培養液を同様に凍結融解、遠心し、3次ウイルス液を得る。3次ウイルス液について、斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により、力価を測定する。このようにして、組み換えアデノウイルスベクターを得ることができる（Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-1324頁；Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn、38巻、182-188頁）。

#### 【0036】

他にも、例えばレトロウイルスベクター（脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁）、アデノ随伴ウイルスベクター（玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁）などを用いることができる。これらは既に確立された方法で、効率的にベクターを生産出来ることが公知となっている。

哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のベクターを製造するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られている。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が知られている。

#### 【0037】

本発明において特に好適な哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、パラミクソウイルスベクターである。「パラミクソウイルスベクター」とは、パラミクソ

ウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。パラミクソウイルス科に属するセンダイウイルス（SeV）は最近、遺伝子導入ベクターとして開発が進められている（Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997; 国際公開番号97/16538号および国際公開番号97/16539号）。SeVベクターは毒性が低く、導入した遺伝子から発現される蛋白質量が極めて高い。また、ベクター内の遺伝子が宿主染色体へ導入されることがないため、安全性にも優れている。SeVベクターのゲノムの安定性は高く、異種遺伝子発現の結果ではウイルスを連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている（Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997)）。また、カプシド構造タンパク質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性（flexibility）など性質上のメリットがある。複製能を有するSeVベクターは、外来DNAを少なくとも4 kbpまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能である。SeVのレプリコンをベースにしたベクターは複製されたウイルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。また、SeVベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ。

#### 【0038】

また、安全性の面においても、ヒトへの病原性が否定されているため、センダイウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうることが示唆される。第一に、プラスミドDNA等による導入遺伝子の発現は、多くの場合、導入したDNAの核局在化または核膜の消失が必要であることが、遺伝子発現の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ（L蛋白質）の両方によってウイルスの複製に伴って駆動される。これは、センダイウイルスが宿主の染色体と相互作用しないことを示しており、染色体異常による細胞の癌化および不死化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性がない。これ

はまた、野生型センドイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センドイウイルスのこれらの特徴は、センドイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センドイウイルスベクターが、インビボまたはエクシボでの遺伝子治療における有望な選択肢の一つとなることを支持するものである。

### 【0039】

本発明において「パラミクソウイルス」とはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明に用いられ得るパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のセンドイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンパーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。本発明においてパラミクソウイルスは、好ましくはパラミクソ亜科 (レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) に属するウイルス、より好ましくはレスピロウイルス属 (Respirovirus) (パラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) とも言う) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明に用いられ得るレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3)、センドイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明においてパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンドイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、ウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

## 【0040】

組み換えパラミクソウイルスベクターは、ウイルスゲノムをコードするDNAに適切な転写プロモーターを連結した組み換えDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、パラミクソウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させ、このRNPを含むウイルス粒子を形成させることによりベクターを生成させることができる。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; 国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダイウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスベクターおよびその他の(-)鎖RNAウイルスベクターをDNAから再構成させることができる。パラミクソウイルスベクターは、通常、(a) パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖 (ポジティブ鎖) をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞 (ヘルパー細胞) で転写させ、(b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収することにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAは NP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。

## 【0041】

また本発明においてウイルスベクターには、ウイルス遺伝子を欠損したベクタ

ーも含まれる。例えばウイルスの複製に必須の遺伝子を欠損させた複製能欠損型ウイルスベクターなどであってもよい。パラミクソウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子および/またはHN遺伝子等を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。このような欠失型ウイルスベクターの製造方法も、公知の方法に従って、または順じて実施することができる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。ベクターからの外来遺伝子の発現量は、例えば、その遺伝子の上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる（国際公開番号 W001/18223）。また、ウイルスベクターは、このウイルス以外に由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターであってもよい。このようなエンベロープ蛋白質には、VSV-Gなどが挙げられる（国際公開番号 W000/70055 および W000/70070参照）。

#### 【0042】

回収した動物細胞感染性ウイルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション（濾過）、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスベクターが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

## 【0043】

TAP阻害蛋白質、およびエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I 重鎖を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞に導入することにより、該細胞で高頻度に目的のエピトープを発現させることができる。本発明は、エピトープ結合 $\beta 2m$ またはエピトープ結合MHC class I 重鎖の製造方法であって、(i)TAP阻害蛋白質、および(ii)エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはエピトープ結合MHC class I 重鎖、を発現可能にコードする（1つまたは複数の）哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程を含む方法を提供する。(i)および(ii)をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、別々である場合も、同一のベクターである場合も、本発明に含まれる。

## 【0044】

また、本発明は、(i)TAP阻害蛋白質、および(ii)エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはエピトープ結合MHC class I 重鎖、を発現可能にコードする（1つまたは複数の）哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞を提供する。(i)および(ii)をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、別々である場合および同一のベクターである場合が本発明に含まれる。また本発明は、 $\beta 2m$ にエピトープを結合させた場合には、エピトープを結合していないMHC class I 重鎖を、また、MHC class I 重鎖にエピトープを結合させた場合には、エピトープを結合していない $\beta 2m$ を、発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがさらに導入された上記哺乳動物細胞を提供する。このベクターは、TAP阻害蛋白質やエピトープ結合蛋白質をコードするベクターと同一のベクターでも別々のベクターでもよい。TAP阻害蛋白質としては、特にUS6およびICP47が挙げられる。また哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターとしては、特にパラミクソウイルスベクターが好ましい。

## 【0045】

本発明の方法を用いて発現させたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、インビトロにおけるCTLアッセイに利用することもできる。CTLアッセイの標的細胞としては、通常CTLと同一個体由来の細胞株、例えばエプシュタインバーウイルス(EBV)を用いてtransformしたB細胞株(auto-lymohoblastoid cell line, auto-LCL)を合成ペ



プチドでパルスしたものが用いられるが、合成ペプチドの代わりに本発明の方法により製造したエピトープ結合 $\beta 2m$ を添加したり、あるいは合成ペプチドの代わりに、例えばTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができる。またヒトの細胞株を使用する場合、例えばTAP阻害蛋白質を発現するベクター、および目的のMHC class I重鎖（膜結合型）を発現するウイルスベクターとそのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2m$ とを発現するウイルスベクターを多重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

#### 【0046】

また、本発明の方法を用いて製造されたエピトープ結合 $\beta 2m$ はエピトープ特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の樹立に使用することができる。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にしHIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞（同一個体由来の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって可能となる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターを感染させた細胞の培養上清（すなわち遊離型エピトープ結合 $\beta 2m$ 蛋白質）でも同様の効果が見られる。また、stimulator細胞に例えばTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta 2m$ とを発現するウイルスベクターを感染させることによって同様にCTLを樹立できる。

#### 【0047】

本発明の方法により得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。すなわち、本発明により得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤となる。本発明により得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用できる。

また、SeVの発現系にて発現したエピトープ結合 $\beta 2m$ は、これが分泌型蛋白質の形で細胞表面上のHLA-A\*2402分子と結合し、CTLに効率良く抗原を提示できる。本発明の方法を用いて製造されるエピトープ結合 $\beta 2m$ はタンパク製剤として利

用することが可能であり、これを精製しウイルスの混入を除去すれば、臨床応用に有用な抗原特異的細胞性免疫誘導剤を得ることができる。本発明の方法を用いて産生されるエピトープ結合  $\beta 2m$  は医薬組成物として有用である。

#### 【0048】

例えば、エピトープ結合  $\beta 2m$  を用いて抗原特異的細胞性免疫を誘導する方法は、具体的には、エピトープ結合  $\beta 2m$  を（エピトープ特異的）CD8陽性T細胞に接触させる工程を含む方法により実施することができる。

#### 【0049】

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、エピトープ結合  $\beta 2m$  は有用である。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にし、HIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞（同一個体由来の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって実施することができる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、例えば本発明の方法で製造したエピトープ結合  $\beta 2m$  を添加しても同様の効果が得られる。

#### 【0050】

また、エピトープ結合  $\beta 2m$  は、インビトロでのCTLアッセイの標的細胞のパルスに有用である。CTLアッセイの標的細胞をパルスする際、合成ペプチドの代わりに本発明の方法で製造したエピトープ結合  $\beta 2m$  を添加しても同様の効果が得られる。通常は細胞表面上に、MHC class I重鎖（膜結合型）+  $\beta 2m$  + ペプチドが既に発現している。ペプチドのパルスは、ペプチド部分の入れ替えを狙ったやり方であるが、エピトープ結合  $\beta 2m$  を用いることにより、高い効率で  $\beta 2m$  + ペプチドとの入れ替えが行われるものと考えられる。既存のエピトープペプチドは、酸処理で除去することができる。

#### 【0051】

また、エキスビボで患者樹状細胞へパルスする際にもエピトープ結合  $\beta 2m$  は有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。例えばエピトープ結合  $\beta 2m$  とTAP阻害蛋白質を発現するウイルス

ベクターを導入した樹状細胞を患者の皮下に接種する。インビトロの項と同様に、細胞表面でMHC class I重鎖+エピトープ結合 $\beta 2m$ の形で発現し、エピトープ特異的CTLを誘導できることが期待される。樹状細胞をペプチドでパルスした場合より、エピトープがMHC class I重鎖上に長く、安定に、さらに高密度に発現する可能性があり、細胞性ワクチン（治療ワクチン）として期待できる。

#### 【0052】

エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、TAP阻害剤またはTAP阻害蛋白質を発現可能なベクターと組み合わせて抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。本発明は、(i)TAP阻害剤またはTAP阻害剤を発現可能にコードするベクター、および(ii)エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖またはエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターを含む組成物に関する。ベクターは、適宜薬学的に許容される溶液中に懸濁させることができる。例えば、ベクターは生理食塩水、培養液、または血清中に含まれてよい。該組成物は、MHC class Iによる外来エピトープの提示の増強剤として有用である。また該組成物は、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤として有用である。TAP阻害蛋白質をコードするベクターと、エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖をコードするベクターは、別々のベクターであってもよく、あるいは同一ベクター内にコードされていてもよい。すなわち、TAP阻害剤を発現可能にコードするベクターとエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターとが同一のベクターである場合も本発明に含まれる。また本発明は、(i)TAP阻害剤またはTAP阻害剤を発現可能にコードするベクター、および(ii)エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖またはエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターの、MHC class Iによる外来エピトープの提示を増強するための使用、および抗原特異的細胞性免疫を誘導するための使用に関する。このようなウイルスベクターは、遺伝子治療のために有用である。本発明は、(i)TAP阻害剤またはTAP阻害剤を発現可能にコードするベクター、および(ii)エピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖またはエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現可能にコードするベクターを含

む医薬組成物を提供する。また、本発明は (i) TAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクター、および (ii) エピトープを融合させたMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ 、または該MHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ を発現可能なベクター、を含むエピトープを提示させるためのキットに関する。(i)と(ii)が分離可能である場合は、それらは分離されていてもよく、または混ぜ合わされていてもよい。キットには、複数種のTAP阻害剤または該阻害剤を発現可能なベクターが含まれていてもよく、また複数種のMHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ 、または該MHC class I 重鎖若しくは $\beta 2m$ を発現可能なベクターが含まれていてもよい。これらは適宜、薬学的に許容される溶液に溶解または懸濁されていてもよい。ベクターとしては、特に動物細胞感染性ウイルスベクターが好ましい。ベクターを含む本発明の組成物およびキットは、抗原特異的細胞性免疫を誘導できるため、感染症や癌などにおいて抗原特異的免疫を誘導するために有用である。本発明の組成物またはキットの遺伝子治療への応用としては、直接（インビボ）投与による遺伝子発現、間接（エキスビボ）投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても投与することができる。

#### 【0053】

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、stimulator細胞での刺激において合成ペプチドを使用する代わりに上記組成物またはキットを適用することによってCTLを樹立できる。

また、インビトロでCTLアッセイの標的細胞のパルスにおいて使用することもできる。合成ペプチドの代わりに例えばTAP阻害下でエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができ、細胞傷害活性を検出することができる。またヒトの細胞株を使用する場合、目的のMHC class I重鎖（膜結合型）を発現するウイルスベクターと、そのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2m$ およびTAP阻害蛋白質を発現するウイルスベクターとを重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

#### 【0054】

さらに本発明の組成物およびキットは、エキスビボで患者樹状細胞でのエピト

ープ発現にも有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この樹状細胞に本発明の組成物を投与して患者の皮下に接種する。特にウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行うことが好ましい。ペプチドやエピトープ結合  $\beta 2m$  蛋白などでパルスしても、樹状細胞上でどれくらいの期間持続発現されるかが問題となりうる。実際にペプチドパルスでは、樹状細胞上でのエピトープは発現が短期間で消失することが指摘されている。その点ウイルスベクターを感染させ、細胞内からエピトープ結合  $\beta 2m$  を発現させれば、長期にわたってエピトープ結合  $\beta 2m$  を発現させることができる。さらに、インビボでの投与によりエピトープ特異的CTLを誘導するインビボ遺伝子治療にも本発明の組成物およびキットは有用である。

#### 【0055】

外来エピトープを発現させるための遺伝子導入の標的となる細胞は、好ましくは抗原提示能を有する細胞である。このような細胞としては、特に樹状細胞 (DC) が挙げられる。例えば、エクスピボにおいて、樹状細胞に、本発明の方法を用いて外来エピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはMHC class I重鎖を発現するベクターを導入することによって、該細胞において所望のMHC class I/ペプチド複合体を高頻度で形成させることができる。この細胞を用いて、抗原特異的T細胞を活性化することができる。エピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはMHC class I重鎖をコードする遺伝子が外来的に導入され、かつTAP活性が阻害された哺乳動物細胞は本発明に含まれる。哺乳動物細胞としては、抗原提示能を有する所望の単離細胞等を用いることができる。特に、該細胞において、MHC class I/ペプチド複合体のうちエピトープを結合させていないサブユニットをコードする遺伝子も外来的に導入することにより、大量のMHC class I/ペプチド複合体を形成させることができる。これらの導入遺伝子は染色体外に存在する発現ベクターにコードされていてもよく、また細胞の染色体に組み込まれていてもよい。膜結合型MHC class I重鎖を発現させれば、該細胞表面に膜結合型MHC class I/ペプチド複合体が発現する。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対して優れた抗原提示能を有する。上記のエピトープ結合  $\beta 2m$  若しくはMHC class I重鎖をコードする遺伝子が外来的に導入され、かつTAP活性が阻害された哺乳動物細胞は、医薬組成物の成分としても有

用である。

#### 【0056】

本発明における組成物は、必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わされていてよい。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、細胞に投与することが可能であり、有効成分の活性を有意に阻害しない材料である。例えば本発明において組成物は、生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などを含み得る。鶏卵で増殖させたパラミクソウイルスベクターを含む組成物等においては尿液を含んでもよい。また細胞を含む組成物は生理食塩水、PBS、または培養液などに懸濁してもよい。また本発明の組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は試薬として、および医薬として有用である。また本発明の組成物はワクチンとして有用である。本発明は、本発明における組成物の試薬、医薬、またはワクチンとしての使用にも関する。ワクチン組成物は、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全Freund'sアジュバント、MF59 (オイルエマルジョン)、MTP-PE (マイコバクテリア細胞壁由来の muramyl tripeptide)、および QS-21 (soapbark tree *Quilaja saponaria* 由来) などのアジュバントを組み合わせることもできる。

#### 【0057】

また、本発明の医薬組成物の投与に際しては、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) IL-2と一本鎖IL-12 との組み合わせ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8591-8596, 1999)、ii) IL-2とインターフェロン- $\gamma$  (米国特許第 5,798,100号)、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、iv) 脳腫瘍を治療対象とした GM-CSF と IL-4 の組み合わせ (J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999)) などが挙げられる。

#### 【0058】

ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して適用することができる。感染症の治療としては、例えば感染性微生物の抗原蛋白のエピトープを解析し、これを結合させた $\beta 2m$ 若しくはMHC class I 重鎖を製造することができる。抗原蛋白としては、例えばインフルエンザにおいては、強毒株H5N1型等のエンベロープ、日本脳炎においては、例えばエンベロープ蛋白質 (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999))、エイズにおいては、例えばHIV gagまたは SIV gag 蛋白質 (J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIVエンベロープ蛋白質、Nef蛋白質、その他のウイルス蛋白質などが挙げられる。コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット (CTB) (Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10): 934-8, Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3): 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク (Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8):949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパクL1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000))などが挙げられる。また、病原性のパラミクソウイルス、例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルスのようなワクチンの必要性の高いウイルスに本発明を適用することもできる。また、日本脳炎のJE-E抗原タンパク質 (特開昭64-74982、特開平1-285498)。ヒト単純ヘルペスウイルスの gD2タンパク質 (特開平5-252965)。C型肝炎ウイルス由来ポリペプチド (特開平5-192160)。偽狂犬病ウイルス由来ポリペプチド (特表平7-502173) などにおけるエピトープを用いることもできる。例えば、これらの病原性微生物に感染した患者由来の細胞を解析して、抗原提示細胞 (APC) において提示された抗原蛋白のエピトープを同定する。HLA型を適宜選択することにより、所望のHLA型に対するエピトープを同定することが可能である。

#### 【0059】

腫瘍特異的抗原に着目し、それらを標的とした多角的な新しい治療戦略や治療法の開発を行うことには腫瘍治療の上で臨床的意義がある。例えば腫瘍治療としては、腫瘍細胞、またはDC細胞などの抗原提示細胞 (APC) にエピトープ結合 $\beta 2m$ 若しくはMHC class I重鎖を発現させたり、エピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体等の蛋白質製剤を投与することができる。

一般的な手法としては、ヘルパーT細胞（Th）への抗原提示能を持つことが知られている樹状細胞（DC）が、CTLに対してもMHCクラスI分子を介して高い抗原提示能を有することが知られており、これを用いたワクチン療法の開発が挙げられる（J. I. Mayordomo et al., Nature Med. 1(12), 1279-1302, (1995)）。腫瘍免疫療法の一例としては、種々の悪性腫瘍にも発現が認められるMAGE抗原を標的とした腫瘍ワクチン療法の確立が藤也寸志ら（国立病院九州がんセンター）により進められている。再発胃腫瘍症例6例、再発食道腫瘍1例の7例に対し治療を施行したところ、食道腫瘍症例で転移リンパ節の縮小、腫瘍マーカーの減少および臨床症状(嚥声)の改善が認められ、胃腫瘍症例では6例中4例で腫瘍マーカーの減少を認めている。副作用は全く認められておらず、腫瘍免疫療法の安全性が示唆されている。また臨床症状の改善や腫瘍マーカーの低下が見られた症例が多く、ワクチンの投与法や適応症例の選別などにより有効な治療法となりうる可能性を示唆している。MAGE-3ペプチドを用いたDCワクチン療法は、実際に臨床試験が開始され、進行再発消化器癌症例に対する安全な腫瘍特異的免疫療法となる可能性が示唆される。しかしながら多数の患者を対象とした予防的ワクチン投与においては、“nature adjuvant”である樹状細胞を各々の患者に対して最適に調整、投与していくのは明らかに頻雑で、非現実的である。何らかの効率的方法が求められている（『山岸 久一ら京都府立医科大学 日本癌治療学会総会1999年10月12日（火）於 岐阜市での発表』）。このような腫瘍ワクチン療法に本発明を適用することは極めて有効であると考えられる。

#### 【0060】

ウイルスが引き金となつてできる腫瘍の予防は、そのウイルスのワクチンによる感染予防により達成されうる。ウイルスが原因の腫瘍は他の原因による腫瘍に比較し、確実に予防が可能となる。例えば、肝臓腫瘍に関わるC型肝炎ウイルス（HCV）、子宮がんに関わるパピローマウイルス（HPV）、成人性白血病の原因であるHTLV-1につき、感染予防と治療を目的としたワクチンがあげられる。肝臓腫瘍は日本の腫瘍発症の中でも高い割合を占める。C型肝炎ウイルスは非経口的に感染し、免疫能が正常の成人であっても高率に慢性化する。感染者の約20%は慢性肝炎、肝硬変を発症するものと考えられる。更に、肝硬変患者の多くで肝細胞癌が



発症する。C型肝炎に対する治療はインターフェロンの登場により患者の一部で治癒に導くことが可能となったが、有効率は当初期待されたほどではなく、半数以上の患者に対して、いまだに有効な治療法がない現状である。一般のウイルス感染の予防は、ワクチン接種により中和抗体を誘導して行うがC型肝炎ウイルスは変異しやすく、現在の所、感染を終息させる中和抗体の存在は証明されていない。ウイルス感染症では中和抗体の誘導以外にCTLを誘導することにより、感染予防が可能であることが知られている。本発明により、このようなケースに対してもCTL活性化を誘導できると期待される。

#### 【0061】

森山貴志(自治医科大学)らは、CTLを誘導する新しい方法として病原体抗原をコードする遺伝子そのものをワクチンとして用いる方法(DNAワクチン)を研究している。その問題点は概説書が示すとおり、発現量が十分でない、投与部位が筋肉などに限られる等がある(『DNAワクチン その現状と新知見; 倉根一郎(感染症研); 今日の感染症; Vol. 19, NO. 3 PAGE. 6-9, 2000』)。また『癌と免疫 癌の特異的免疫療法 HER2由来ペプチドによる乳癌のワクチン療法; 影山慎一, 渡辺正人, 日浅厚則, 珠玖洋(三重大 医); 現代医療; Vol. 32, NO. 5 PAGE. 1167-1172 2000』では乳癌などで過剰発現が認められているチロシンキナーゼ活性を持つ膜型糖蛋白質HER2を利用した癌ワクチンについて概説されている。例えば、本発明に従いウイルスベクターを利用して癌ワクチンを製造すれば、このようなDNAワクチンよりも高い効果を発揮することが期待される。哺乳動物の広範な組織で発現可能なウイルスベクター(アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクターなど)を用いてベクターを構築すれば、高い効果を有するワクチンを提供することが可能と考えられる。

#### 【0062】

子宮がんは女性のみの腫瘍であるが、HPVによる感染予防と治療ワクチンの開発の重要性は変わらない。HTLV-1は、母子感染が主な感染ルートと理解されるに

至ったが、それ以外の感染経路もある。近年発見されたHGVは病原性は明確になっていないが、HCVと共に社会に拡がっており、このようなウイルスの防疫も公衆衛生上必要であり、本発明の適用の対象となる。

#### 【0063】

抗原提示細胞の利用並びに投与経路に関する検討も重要である。最も研究されている投与経路は、樹状細胞（DC）がCTLに対してもMHC class I分子を介する抗原提示能を有することを利用して、末梢血に存在する単球（monocyte）を用いて試験管内でDCに分化させ、これを静脈内注射で体内にもどす方法を用いたワクチン療法である。この方法は相当の施設と、培養時間を必要とする方法である。最近注目される方法は皮膚を利用したワクチン療法である。ランゲルハンス細胞（LC）を含む樹状細胞は、近年その細胞上のMHC class I分子を介してウイルス抗原や癌抗原などの内在性の抗原を効率的にCTLに提示することが判明し、この細胞を用いた抗ウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法の研究が大きく注目されている。皮膚の表皮には多数のLCが常在しているので、皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチド、さらには抗原含有遺伝子の塗布により効果的なDNAワクチン法が開発できる可能性がある。しかしながら正常皮膚でLCは休止状態にありThやCTLへの抗原提示能は低く、リンパ節内への移動性にも富まないで正常皮膚を用いてのウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法は実現が難しい。これを解決する方法として、瀬尾尚弘、瀧川雅浩（浜松医科大学）らは皮膚最外層の角質層バリアをテープストリッピング(TS)を8～15回繰り返すことによって破壊し、その皮膚でLCが活性化し、リンパ節内へ移動し効率的にTh細胞に抗原提示することを実証した（特願平10-316585 Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin foreexperimental tumor immunoprophylaxis; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 97, Issue 1, 371-376, January 4, 2000）。このような方法はバリア破壊皮膚へのウイルスペプチド、癌ペプチドさらには抗原DNAの適用においてウイルスワクチンまたは癌治療の可能を広げるものである。本発明においても、これらの投与方法を適用することができる。

#### 【0064】

さらに確実な臨床応用のためには、ヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、そ

の認識する癌反応性CTL誘導抗原遺伝子をクローニングし、癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異的免疫療法の標的分子を開発することが重要である。対象とする患者と同じ型を持つHLAにより提示されたエピトープを同定し、これを用いてワクチンベクターやペプチドワクチンを製造することにより、より効果的に免疫を誘導することが期待できる。

#### 【0065】

日本において多発する癌、例えば肺癌、消化管癌(食道、胃、大腸癌)、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病のなかでも、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌を治療ターゲットする事は臨床上有益である。上皮性癌は日本における成人悪性腫瘍の大半を占めるのみならず、世界にも最も頻発する癌である。よって、上皮性癌細胞特異的抗原のエピトープは、本発明において好適に用いられる。またHLAとしては日本でも発現頻度の高いHLA-A24(癌患者の約6割)、HLA-A2(約4割)、及びHLA-A26(約2割)抗原拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定が特に重要である。次いで、HLA-A11(2割)、-A31(2割弱)、-A33(2割弱)を対象とする同定も重要である。日本人の95%以上は少なくともHLA-A24、-A2、-A26、-A31、-A33のいずれか一方を保有する。また上記HLAアレルは人種をこえて広く認められる。したがってこれらのタイプのHLAを持つ細胞から癌反応性CTL誘導抗原遺伝子を同定し、これを本発明に適用することが好ましい。

#### 【0066】

伊東恭悟(久留米大 医)らは日本人に多発するヒトHLA-クラス・拘束性上皮癌(腺癌及び扁平上皮癌)に対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌反応性CTL誘導能をもつ抗原遺伝子をすでにクローニングしている。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるインビトロにおけるキラーT細胞誘導能の解析が行われている(食道癌患者自己CTL癌局注による特異的養子免疫療法後の末梢血リンパ球に対するクローニングとその解析: 唐宇飛, 山名秀明, 末吉晋, 新谷文彦, 田中寿明, 久保田雅博, 峯孝志, 笹原弘子, 伊東恭悟(久留米大); 日本消化器外科学会雑誌; Vol. 33, No. 7, Page 1191, 2000)。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーよ

り4種類の遺伝子(SART-1~SART-4)、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子がクローニングされ、それらをコードする蛋白が解析されている。SART-1遺伝子導入した癌細胞は選択的アポトーシスを誘導した。またHLA-A24拘束性ペプチド(SART-1 690-698)が強いCTL誘導およびHLA-A26拘束性ペプチドSART-1 736-744によるHLA-A2601、-A2602、-A2603癌患者CTL誘導が確認されている(『腫瘍の抗原ペプチド療法 SART-1抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法; 山名秀明, 伊東恭悟(久留米大 医); 医学のあゆみ; Vol. 190, NO. 2 PAGE. 129 - 133 1999』、『SART1ペプチドによるサブタイプの異なるHLA-A26陽性健康人及び癌患者末梢血リンパ球からのCTLの誘導; 井上佳子(国立腫瘍セ 研); 中尾真修, 松永和子, 増岡・菊地慈, 山名秀明, 伊東 恭悟(久留米大 医); 日本癌学会総会記事』)。さらにSART-3癌反応性CTL誘導抗原遺伝子:140 kDのSART-3抗原が増殖細胞に選択的に発現し、かつ癌細胞に限って核内にも発現し、同抗原内にHLA-A24+癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つの9個のアミノ酸からなるペプチド(nonapeptide)が同定されている(『転移性癌患者におけるHLA-A24拘束性1ck由来ペプチドを用いた細胞傷害性T細胞の誘導と機能解析; 山名秀明, 笹富輝男, 宮城佳昭, 唐宇飛, 白水和雄, 伊東恭悟(久留米大 医); 日本外科学会雑誌; Vol. 101, 臨時増刊号 PAGE. 417 2000』)。これらの癌反応性CTL誘導抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現はSART-1抗原は扁平上皮癌の60~80%、乳癌を除く腺癌の40~50%に発現していた。またSART-2は扁平上皮癌の60%以上に、SART-3は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍で発現していた。これに対し、これらの抗原は正常組織には睾丸を除き発現されていない(腫瘍免疫 9 ヒト癌特異的キラーT細胞により認識される抗原 2へん平上皮癌反応性CTL誘導抗原SART-1およびペプチドワクチン; 伊東恭悟, 七条茂樹, 山名秀明(久留米大 医); 免疫 Immunology Frontier; Vol. 9, No. 3, Page 195-204, 1999)。HLA-A26は日本人の22%、HLA-A\*2402は日本人の約60%が保有している。これらより、日本における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられている。現在久留米大学において上記ペプチドを用いての第1相臨床試験が計画されている(臨床ガイドライン解説 第1回腫瘍ペプチドワクチン臨床試験のガイドラインについての提案; 山名秀明, 伊東恭悟(久留米大 医); 分子細胞治療; Vol

1, No. 1, Page 89-95, 2000)。これらの抗原蛋白質に由来するエピトープに本発明を適用することは有効であると考えられる。

#### 【0067】

以上に記載したペプチド抗原をコードする遺伝子を本発明に用いれば、腫瘍および病原性感染微生物等に対する有効な免疫治療を行うことが可能となる。その他のエピトープとしては、癌抗原 Muc-1 または Muc-1様ムチンタンデムリピートペプチド（米国特許第 5,744,144号）、メラノーマ gp100抗原などが挙げられる。これらの遺伝子による治療は、乳癌、結腸癌、脾臓癌、前立腺癌、肺癌等、幅広い応用が示されている。また、上記に示した腫瘍抗原ペプチドHER2遺伝子の正常組織および腫瘍での発現は、乳癌、卵巣癌、胃癌、非小細胞性肺癌において約20から40%の症例に遺伝子増幅または発現の増加が認められ、その発現増加は腫瘍特異性の傾向が高いと考えてよい。卵巣癌患者および健常人末梢血由来単核球より精製した樹状細胞とHER2由来の2種の9merペプチド（HER2p63-71、p780-788）なども例示することができる（Eur. J. Immunol. 2000, 30: 3338-3346）。また、CEA陽性進行固形癌に対して、CEAエピトープペプチドを用いた癌ワクチン療法（特異能動免疫療法）に本発明の医薬組成物等を適用することも考えられる（Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 90-96）。例えば、成分採血により患者より多量の末梢血単核細胞を採取した後、その単球分画からIL-4、GM-CSF添加下に樹状細胞(DC)を誘導、誘導されたDCに本発明の方法を用いて製造したCEAペプチドのエピトープを含む $\beta$ 2mあるいはベクターを導入し、“DCワクチン”として皮内投与することが考えられる（CEA特異的能動免疫療法により血清CEA値と抗腫瘍効果に解離を認めた肺癌 骨転移の一例；清水啓二，上田祐二，伊藤剛，岡本和真，白数積雄，阪倉長平，大辻英吾，北村和也，山岸久一（京都府医大）；日本臨床外科学会雑誌）。

#### 【0068】

また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えばI型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドをエピトープとして利用することが考えられる（Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2):189-94）。

## 【0069】

本発明の組成物をワクチンとして用いる場合、抗原特異的細胞性免疫を少なくとも部分的に誘導するのに十分な量を投与される。但し、投与蛋白質量、または導入遺伝子の発現量は、その有効レベルおよび中毒レベルを考慮して決められるべきである。投与経路は適宜選択することができるが、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、または皮下等に行われうるがそれらに限定されない。また局所あるいは全身に投与し得る。細胞性免疫の誘導は、本発明に記載したようなCTLアッセイ等により検出することができる。

## 【0070】

ベクターを含む組成物の投与により細胞に導入された遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出・定量することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、導入遺伝子発現の検出を容易にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するようにベクター中に組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、CAT、アルカリホスファターゼ、またはGFPをコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限されない。

## 【0071】

エピトープ結合  $\beta 2m$  または MHC class I/ペプチド複合体などの蛋白質組成物の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。例えば、蛋白質量として、10ng/kg から 100  $\mu$ g/kg、好ましくは 100ng/kg から 50  $\mu$ g/kg、より好ましくは 1  $\mu$ g/kg から 5  $\mu$ g/kg の範囲であるとよい。複数のエピトープを組み合わせて投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。エピトープ結合  $\beta 2m$  または MHC class I/ペプチド複合体などの蛋白質組成物は、適宜、薬学上容認可能な担体を含んでよい。

## 【0072】

ベクター組成物の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。パラミクソウイルスベクターであれば、投与されるベクターの濃度は好ましくは約 $10^5$  pfu/mlから約 $10^{11}$  pfu/ml、より好ましくは約 $10^7$  pfu/mlから約 $10^9$  pfu/ml、最も好ましくは約 $1 \times 10^8$  pfu/mlから約 $5 \times 10^8$  pfu/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。投与量は、好ましくは約 $10^5$  pfu/回から $10^{11}$  pfu/回、より好ましくは約 $10^7$  pfu/回から $10^9$  pfu/回、最も好ましくは約 $10^8$  pfu/回から $10^9$  pfu/回で投与する。複数のベクターを組み合わせ投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。

## 【0073】

本発明の組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

## 【0074】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

## 【0075】

【実施例1】 HLA-A\*2402遺伝子およびヒト $\beta 2m$ 遺伝子の単離

ヒトのMHC class Iの1つである HLA-A\*2402遺伝子、およびヒト $\beta 2m$ 遺伝子は、HLA-A24 を持つ健常人末梢血単核球 (PBMC) 由来のメッセンジャーRNA (mRNA) よりクローニングした。mRNAの分離には Micro-FastTrack Kit (Invitrogen) を用いた。cDNA 合成には AMV-RT First-strand cDNA synthesis kit (LIFE SCIENCE)を用いた。

得られたcDNA を鋳型にしてHLA-A\*2402遺伝子はプライマー HLA-5P2, HLA-3Bを用いて、 $\beta 2m$ 遺伝子は b2m-5', b2m-3' を用いてPCRにより増幅した。

HLA-5P2, 5'-GGGCGGATCCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3' (配列番号: 7)

HLA-3B, 5'-CCGCCTCGAGCTGGGGAGGAAACAGGTCAGCATGCGAAC-3' (配列番号：8)

b2m-5', 5'-GGCACGAGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGC-3' (配列番号：9)

b2m-3', 5'-AATTTGGAATTCATCCAATCCAAATGCGGC-3' (配列番号：10)

#### 【0076】

PCR は94℃30秒、58℃30秒、72℃1分、35サイクルの後、72℃7分で伸長反応を行った。PCRは Ex Taq (Takara) を用いて行った。得られたPCR産物はpGEM-T vector system (Promega) を用いてクローニングし(それぞれA\*2402/pGEMおよびβ2m/pGEMとした)、塩基配列をシーケンス反応にて確認した。シーケンス反応は dye terminator chemistry (Big-Dye terminator cycle sequencing Ready Reaction kit; Applied Biosystems) を用い、ABI-377 DNA Sequencer にて電気泳動を行った。

#### 【0077】

[実施例2] エピトープ結合β2m発現ベクターの作製

以下のようにして、エピトープ結合β2mを発現するSeVベクターをコードするプラスミド(e/β2m/pSeVb)を構築した。β2mのシグナル配列の下流への各エピトープ、リンカーの挿入、センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI部位の付加はPCR法によって行った(図1)。リンカーのアミノ酸配列は、GGGS(配列番号：1)が3回繰り返した配列(GGGSGGSGGGS/配列番号：11)となるようにした。

使用したプライマー;

e/b2m-a1, 5'-GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTTCTGGTGGAGGTTTCGATCCAGCGTACTCCAAAGATT-3' (配列番号：12)

e(Nef)-a2, 5'-TCTGGCCTGGAGGCTAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTTCGGAGGAGGTGGCGGTCC-3' (配列番号：13)

e(Env)-a2, 5'-TCTGGCCTGGAGGCTAGATACCTAAGGGATCAACAGCTCCTAGGGATTGGAGGTGGCGGTCC-3' (配列番号：14)

e/b2m-a3, 5'-TGCGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT-3' (配列番号：15)

b2m-d, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTTACAT



GTCTCGATCCCACTT-3' (配列番号: 16)

【0078】

$\beta$ 2m/pGEMを鋳型に e/b2m-a1, b2m-d を用いて 94℃ 1分、48℃ 1分、72℃ 1分、にて15サイクル行った後、72℃ 7分にて伸長反応を行った。得られたPCR産物を鋳型としてe(Nef)-a2, あるいは e(Env)-a2 と b2m-d を用いて同条件にてPCRを、さらにそのPCR産物を鋳型として e/b2m-a3 と b2m-d を用いて同条件にてPCRを行い、e/Nef138- $\beta$ 2m, e/Env584- $\beta$ 2m断片を得た。e/Nef138- $\beta$ 2m, e/Env584- $\beta$ 2m断片を pGEM-T vector system (Promega) を用いてクローニングし、塩基配列をシーケンス反応にて確認した。塩基配列確認後NotIにて消化し、pSeV18<sup>+</sup>b(+)のNotI切断部位に挿入し、再度塩基配列を確認し e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb, e/Env584- $\beta$ 2m/pSeVb を得た (「e/ $\beta$ 2m/pSeVb」と総称する)。また、本来の $\beta$ 2mのみを発現するセンダイウイルス  $\beta$ 2m/pSeVb は b2m-a (5'-TGCGGCCCGCGTACGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' / 配列番号: 17) と b2m-d を用いて上記と同様に  $\beta$ 2m/pSeVb を得た。Nefのエピトープ (Nef138-10) のアミノ酸配列を配列番号: 21 に、Envのエピトープ (Env584-11) のアミノ酸配列を配列番号: 23 に示す。

【0079】

【実施例3】 膜結合型MHC class I重鎖発現ベクターの作製

センダイウイルス E, S シグナル、NotI部位の付加は PCR にて行った (図2)。

使用したプライマー;

A24-a#, 5'-TGCGGCCCGCGTACGCCGAGGATGGCCGTCATGGCGCCCCG-3' (配列番号: 28)

A24-d4, 5'-TTGCGGCCCGGATGAACCTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCACACTTTAC AAGCTGTGAG-3' (配列番号: 29)

A\*2402/pGEM を鋳型として A24-a#, A24-d4 を用い94℃ 1分、48℃ 1分、72℃ 1分、にて15サイクル行った後、72℃ 7分にて伸長反応を行い、A24full断片を得た。以下e/ $\beta$ 2m/pSeVb 作製時と同様に A24full/pSeVb を得た。

【0080】

〔実施例 4〕 ICP47発現ベクターおよびICP47/エピトープ共発現ベクターの作製

単純ヘルペス 1 型ウイルス (HSV-1) 由来の ICP47 (US12) 遺伝子がクローニングされているUS12/pGEX-5X-2 は 文献「McGeoch, D.J., Nucleic Acids Res. 14(4):1727-1745 (1986)」に記載されている。ICP47遺伝子断片へのヒスチジンタグ (his), センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI部位の付加は PCRにて行った (図 3)。

使用したプライマー;

ICP-Esn, 5'-TGCGGCCGCAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAACGTACGGCCGAGATGTCGTGGGCCCTG GAAAT-3' (配列番号: 34)

ICPhis-R, 5'-TTGCGGCCGCTATCAATGGTGGTGATGGTGGTGAGCTCCACGGGTACCGGATTAC-3' (配列番号: 35)

US12/pGEX-5X-2 を鋳型として用い94℃ 1分48℃ 1分、72℃ 1分、にて15サイクル行った後、72℃ 7分にて伸長反応を行い、ICP47<sub>his</sub>断片を得た。以下、e/ $\beta$  2m/pSeV 作製時と同様にこの断片を pSeV18<sup>+</sup>c(+) (Kato, A. et al., J. Virol. 73(11):9237-9246 (1999)) に導入して ICP47<sub>his</sub>/pSeVc を得た。

e/Nef138- $\beta$  2m/pSeVb と ICP47<sub>his</sub>/pSeVc をKpnI, SpnI (New England BioLab) で消化し、e/Nef138- $\beta$  2m/pSeVb のe/Nef138- $\beta$  2m を含む断片 (4kb) とICP47<sub>his</sub>/pSeVc の ICP47<sub>his</sub> を含む断片 (15kb) を Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いてライゲーションを行い、<e/Nef138- $\beta$  2m+ICP47<sub>his</sub>>/pSeV を得た (図 4)。

【0081】

〔実施例 5〕 US6発現ベクターおよびUS6/エピトープ共発現ベクターの作製

ヒトサイトメガロウイルス (CMV) AD169 株ウイルス液は文献「Chen, Z. et al., Virology 258(2):240-248 (1999)」に記載されている。CMV AD169 株ウイルス液からのDNA抽出液を鋳型としてPCR 反応を行った (図 3)。

使用したプライマー;

US6-a, 5'-TGCGGCCGCCACTCCTTCACTATGGATCTCTTG-3' (配列番号: 36)

US6his-d1, 5'-CTACGGCGTACGTCAATGGTGGTGATGGTGGTGAGCTCCGGAGCCACAACGTCCAAT-

3' (配列番号: 37)

US6his-d2, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGTCA-3' (配列番号: 38)

US6-a, US6his-d1 を用い94℃, 1分、48℃, 1分、72℃, 1分、にて15サイクル行った後、72℃, 7分にて伸長反応を行い、US6his断片を得た。以下e/ $\beta$ 2m/pSeVb 作製時と同様に US6his/pSeVc を得た。

<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his>/pSeV と同様に e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVb と US6his/pSeVc の組み換えによって <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/pSeV を得た (図4)。

### 【0082】

[実施例6] センダイウイルスベクターの再構成および感染

pSeV18<sup>+</sup>b(+), pGEM-L, pGEM-P, pGEM-N, vTF7-3 は Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466 に記載されている。センダイウイルスベクターの再構成は、上記文献に記載の方法に従って行った。e/Nef138- $\beta$ 2m/pSeVbおよびe/Env584- $\beta$ 2m/pSeVbから、それぞれe/Nef138- $\beta$ 2m/SeVbおよびe/Env584- $\beta$ 2m/SeVbを得た (e/ $\beta$ 2m/SeVbと総称する)。またA24full/pSeVbからA24full/SeVbを得た。

ICP47his/pSeVcおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his>/pSeVから、それぞれICP47his/SeVcおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his>/SeVを得た。また、US6his/pSeVcおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/pSeV から、それぞれUS6his/SeVcおよび<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/SeVを得た。

サル腎臓由来細胞株 CV-1 および LLCMK2 は、10% ウシ胎児血清 (FCS)、100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン (Life Technologies) を含む MEM (SIGMA) 培地 (M10) にて培養した。以下のセンダイウイルスの感染においては、特に断らない限り、各 m.o.i. にて組換えセンダイウイルスを CV-1細胞に感染させ、無血清MEMにて三日間培養した。

### 【0083】

[実施例7] エピトープ結合  $\beta$ 2m (e/ $\beta$ 2m) の回収および定量

e/ $\beta$ 2m/SeVbまたは $\beta$ 2m/SeVbを感染させた CV-1 細胞の培養上清を、センダイ

ウイルス粒子を除去するため、 $40,000\times g$  で遠心し上清を回収した。

培養上清中の $e/\beta 2m$ の定量はサンドウィッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて行った。Capture 抗体には抗ヒト $\beta 2$ ミクログロブリンモノクローナル抗体 (DACO)  $2.5\mu g/ml$  を、detector 抗体には抗ヒト $\beta 2$ ミクログロブリンモノクローナル抗体パーオキシダーゼ標識 (DAKO)  $500ng/ml$  を用い、発色には TMB パーオキシダーゼ発色キット (BIO-RAD) を用いた。

標準サンプルに精製ヒト $\beta 2$ ミクログロブリン (Biogenesis) を用いた。

#### 【0084】

##### 〔実施例 8〕 Nef138-10 特異的CTLクロンの樹立

HLA-A\*2402 を持つ HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を  $3\times 10^5/96well$  ずつ R10  $100\mu l$  で一晚培養した。次の日に stimulator細胞 ( $0.2\mu g/ml$  PHA (SIGMA)、10% Lymphocult-T (Biotest) を含む RPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) で一晚活性化し  $3,000 rad$  にて放射線照射を行った後、 $10\mu M$  の Nef138-10 で1時間パルスした自己の PHA-blast) を加え、抗ヒト CD28  $1\mu g/ml$  存在下で2週間培養した。その後1週間おきに stimulator細胞 ( $10,000 rad$  で放射線照射し  $10\mu M$  Nef138-10 でパルスした自己の Epstein-Barr virus transformed B細胞株 (B-LCL)) で刺激を加えた。2～4 回刺激後、CTL活性が確認できたらクローニングを行った。

クローニングは  $0.8 cell/well$  の細胞を  $1\times 10^5 cell/well$  stimulator細胞 ( $10,000 rad$  の放射線照射後、 $10\mu M$  Nef138-10 でパルスをした 自己の B-LCL)、 $5\times 10^4 cell/well$  feeder細胞 ( $3,000 rad$  で放射線照射した健常人 PBMC) とともに 10% Lymphocult-T, 2.5% PHA-sup (健常人 PBMC ( $3\times 10^6/ml$ ) を  $0.2\mu g/ml$  PHA で 48 時間刺激した培養上清) 存在下で 3～4 週間培養した。

#### 【0085】

##### 〔実施例 9〕 膜結合型 MHC class I/ペプチド複合体を形成する SeV 導入細胞の CTL による認識

CTL  $^{51}Cr$  放出アッセイを以下のようにして行った。ヒト CD4<sup>+</sup> Tリンパ球株 H9 を 10% FCS, 100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン を含む RPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) にて培養した。 $2\times 10^3 cell/well$  の標的細胞 (ヒト T細胞

株 H9) を  $100\mu\text{Ci Na}_2\text{CrO}_4$  で2時間ラベルし、R10 にて3回洗った後、 $10\mu\text{M}$  のペプチドで1時間パルスした。SeVベクター導入細胞を標的細胞とする場合は、ラベルの17 時間前 (すなわち、エフェクター細胞を添加する20時間前) に図 5 に示す組み合わせでSeVベクターの感染をm.o.i.=10:2で行った。各 E:T 比 (エフェクター細胞: 標的細胞比) にしたがって実施例 8 の細胞をエフェクター細胞として加え4時間  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし、その上清中の  $^{51}\text{Cr}$  を  $\gamma$  カウンターで測定した。自然放出 (Spontaneous release) の測定にはエフェクター細胞の代わりに R10 を、最大放出 (Maximum release) の測定にはエフェクター細胞の代わりに 4% TritonX-100/PBS を入れた。

特異的リシス (Specific Lysis) (%) は [各サンプルのcpm - 自然放出 (Spontaneous release) のcpm] / [最大放出 (Maximum release) のcpm - 自然放出 (Spontaneous release) のcpm]  $\times 100$  で計算した。

膜結合型MHC class I/ペプチド複合体のCTLによる認識を調べた結果を図 5 に示した。A24full/SeVb と e/Nef138- $\beta 2\text{m}$ /SeVb を共導入した細胞において、抗原特異的CTL活性化を検出できることが判明した。

#### 【0086】

[実施例 10] SeV導入細胞から回収したエピトープ結合  $\beta 2\text{m}$  の効果

SeV導入細胞で産生されたエピトープ結合  $\beta 2\text{m}$  を調製するため、e/Nef138- $\beta 2\text{m}$ /SeVbをH9細胞にm.o.i.=2で導入し、3日後に培養上清を回収し濾過してエピトープ結合  $\beta 2\text{m}$  を含む溶液を得た。A24full/SeVbを感染させたH9を標的細胞として実施例 9 と同様のCTLアッセイを行い、ペプチドでのパルスと上記で得たエピトープ結合  $\beta 2\text{m}$  を含む溶液でのパルスを比較した。

エピトープ結合  $\beta 2\text{m}$  の効果を図 6 に示した。SeV導入細胞から回収したエピトープ結合  $\beta 2\text{m}$  を標的細胞の培養液に添加することによって、抗原特異的CTL活性を検出できることが判明した。

#### 【0087】

[実施例 11] ICP47, US6による細胞表面MHC class I/ペプチド複合体のdown regulation

ヒトCD4<sup>+</sup> Tリンパ球株H9、MT-2、マウスのハイブリドーマA11.1M (Foung, S.K

.H., et al., 1986, Human Immunol. 15:316-319) は10% FCS, 100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリンを含むRPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10) にて培養した。HIV-1 感染者から誘導した CTL line, CTL clone は 10% Lymphocult-T (Biotest) を含むR10にて培養した。

#### 【0088】

ヒトCD4<sup>+</sup> Tリンパ球株 H9 にICP47<sup>his</sup>/pSeVc, US6<sup>his</sup>/pSeVc をm.o.i. 3 にて感染させ、18, 24, 30, 42 時間後に抗MHC class I モノクローナル抗体 3F10 FITC標識 (Ancell)で細胞表面を染色し、フローサイトメトリーにて解析した。100倍希釈した抗MHC class I抗体、3F10-FITCと4℃、20分間反応させた後、3回洗浄し1% パラホルムアルデヒドを含むPBS (Phosphate Buffered Saline) にて固定した。染色および洗浄には2% ウシ胎児血清、0.1% アジ化ナトリウムを含むPBSを用いた。フローサイトメトリーは FACS Caliber (Beckton Dickinson) にて行い、解析にはFlowJo Ver. 3.3 (Treestar) を用いた。

対照として用いた野生型SeVを感染させた細胞では、MHC class I/ペプチド複合体の発現量に有意な変化は検出されなかったが、ICP47<sup>his</sup>/SeVcおよびUS6<sup>his</sup>/SeVcを感染させた細胞では時間の経過とともにMHC class I/ペプチド複合体が減少し、新規の MHC class I/ペプチド複合体の膜表面の発現が抑制されていることが示唆された (図7)。しかしながら既存のMHC class I/ペプチド複合体が存在しているため、劇的には減少していない。

#### 【0089】

[実施例12] 既存のMHC class I/ペプチド複合体への酸処理の効果

TAPの阻害により新規のMHC class I/ペプチド複合体の発現を抑制できることが示されたことから、次に既存のMHC class I/ペプチド複合体を酸処理により除去する処理による効果を確認した。

酸処理によるペプチドの解離は、MT-2細胞 (HLA-A24<sup>+</sup>) を4℃のpeptide stripping buffer (0.13M citric acid (pH3), 66mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 17μg/ml Phenol Red) 200μlで1分間処理し、その後 12mlのRPMI1640 にて中和することにより行った。処理直後 (0時間)、1、3、6時間後に抗HLA-A24抗体産生ハイブリドーマ、A11.1Mの培養上清、抗マウスIgG抗体FITC標識 (Imunotech) で染色

し、上記と同様にフローサイトメトリーにて解析した(図8)。

酸(pH 3)で細胞を処理することにより、膜表面 MHC Class I/ペプチド複合体上のペプチドが剥がれ、細胞表面上の MHC class I/ペプチド複合体が減少することが示された。また、6時間後には元のレベルまで回復することが示された。

#### 【0090】

〔実施例13〕 酸処理およびTAP阻害蛋白質発現ベクターによる細胞表面 MHC class I/ペプチド複合体の減少

酸処理が既存のMHC class I/ペプチド複合体を減少させることがわかったので、TAP阻害蛋白質発現ベクター感染後TAP阻害蛋白質が十分量発現した後(14時間後)、酸処理を施し既存のMHC class I/ペプチド複合体を除去し、さらに6時間後に細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体を解析することによって、TAP阻害蛋白質による新規のMHC class I/ペプチド複合体の細胞膜表面の発現抑制の効果を調べた。

MT-2細胞にICP47<sub>his</sub>/SeVまたはUS6<sub>his</sub>/SeVをm.o.i. 3にて感染させ、14時間後に実施例12と同様に酸処理を行い、その6時間後に実施例12と同様にMHC class I/ペプチド複合体(A11.1M)で細胞表面を染色し、フローサイトメトリーにて解析した(図9)。ICP47, US6ともに新規のMHC class I/ペプチド複合体の細胞表面への発現を効果的に抑制していることが示された。また、その抑制効果はほぼ同程度であることが確認された。

#### 【0091】

〔実施例14〕 TAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2m共発現ベクターによるTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2mの同時発現

実施例5で作製したTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2mを共に発現するベクターが実際に両蛋白質を発現しているかをウエスタンブロットにて解析した。

CV-1細胞にe/Nef138- $\beta$ 2m、US6<sub>his</sub>を各々発現するSeV、および共発現するSeV、野生型SeVをm.o.i. 3にて感染させ、その24時間後に感染細胞を回収した。回収した感染細胞をTNE Buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 10 $\mu$ g/ml aprotinin)にて溶解し、その可溶画分にSDS-PAGEを行い

、さらに抗(His)<sub>6</sub> 抗体、抗 $\beta$ 2m抗体にてウエスタンブロッティングを行い、US6<sub>his</sub>、e/Nef138- $\beta$ 2mの蛋白発現を確認した(図10)。PVDF膜にブロッティングした後、ブロッケーヌ(大日本製薬)にてブロッキング後1000倍希釈した抗(His)<sub>6</sub>抗体 Penta-His Antibody (QIAGEN)、または抗 $\beta$ 2m抗体 (Immunotech) と4℃、1時間反応させた。4回洗浄後2000倍希釈した抗マウスIgG 抗体HRP標識 (Roche) と室温1時間反応させ、4回洗浄後Lumi-Light plus substrate (Roche) を用いて発色させた。検出はLumi Imager F1 (Boehringer Mannheim)を用いて行った。洗浄にはTBS-T (20mM Tris-HCl (pH7.5)、500mM NaCl, 0.05% Tween-20)を用い、抗体の希釈には10倍希釈したブロッケーヌを用いた。<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6<sub>his</sub>>/SeV感染細胞においてUS6<sub>his</sub>、e/Nef138- $\beta$ 2mの発現が確認された。US6<sub>his</sub>の発現量もUS6<sub>his</sub>/SeVcとほぼ同程度であることが確認された。

#### 【0092】

[実施例15] TAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2m共発現ベクターによる酸処理後のMHC class I/ペプチド複合体の回復

実施例13、14より酸処理を施したTAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2m共発現ベクター感染細胞では内在性蛋白質由来のエピトープを提示したMHC class I/ペプチド複合体の細胞膜表面の発現が抑制され、TAPを介したペプチドの輸送を必要としないエピトープ結合 $\beta$ 2mと結合しているMHC class I/ペプチド複合体が高密度に発現していると考えられる。

MT-2細胞にICP47<sub>his</sub>/SeVcまたはUS6<sub>his</sub>/SeV、<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47<sub>his</sub>>/SeVまたは<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6<sub>his</sub>>/SeVをm.o.i. 3にて感染させ、14時間後に実施例13と同様に酸処理を行い、その6時間後に実施例13と同様にMHC class I/ペプチド複合体 (A11.1M) で細胞表面を染色し、フローサイトメトリーにて解析した(図11)。ICP47<sub>his</sub>/SeVc、US6<sub>his</sub>/SeVc感染細胞ではともに細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現が抑制されているが、<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47<sub>his</sub>>/SeV、<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6<sub>his</sub>>/SeV感染細胞では野生株SeV感染細胞とほぼ同レベルまでMHC class I/ペプチド複合体が回復している。これは、TAP阻害蛋白質とエピトープ結合 $\beta$ 2m共発現ベクター感染細胞ではエピトープ結合 $\beta$ 2mを結合しているMHC class I/ペプチド複合体が非常に高密度に発現していることを示し



ている。

【0093】

【発明の効果】

本発明により、哺乳動物細胞においてエピトープ結合MHC class Iまたは $\beta 2m$ を発現させる場合に、内因性のエピトープの提示を抑制することによって目的の外来エピトープを効率的に提示させることが可能となった。これによりある特定の（単一の）エピトープを提示するMHC class I/ペプチド複合体を細胞表面に高密度に発現することが可能となる。インビボおよびエクシボでエピトープ結合MHC class Iまたは $\beta 2m$ を発現するベクターを導入する際に本発明の方法を適用すれば、目的の抗原に対して特異的な細胞性免疫を効果的に誘導することが可能である。本発明は、感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などにおける遺伝子治療等に有用である。

【0094】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research INC.

<120> Methods for enhancing MHC class I presentation of  
an exogenous epitope by inhibition of TAP activity

<130> D3-A0102

<140>

<141>

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 1

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 3

Gly Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 4

Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly

20

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 5

Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
1                      5                      10                      15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                    20                      25                      30

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 6

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly

1

5

10

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 7

gggcggatcc ggactcagaa tctccccaga cgccgag

37

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 8

ccgcctcgag ctggggagga aacaggtcag catgggaac

39

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 9

ggcacgagcc gagatgtctc gctccgtggc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 10

aatttggaat tcatccaatc caaatgcggc

30

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 11

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 12

ggaggtggcg ggtccggagg tggttctggt ggaggttcga tccagcgtac tccaaagatt 60

<210> 13

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 13

tctggcctgg aggctagata tccactgacc ttiggtatggt gcttcggagg aggtggcggg 60

tcc

63

<210> 14

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 14

tctggcctgg aggctagata cctaagggat caacagctcc tagggattgg aggtggcggg 60

tcc

63

<210> 15

<211> 81

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 15

tgcggccgcc gtacggccga gatgtctcgc tccgtggcct tagctgtgct cgcgctactc 60

tctcttttctg gcctggaggc t

81

<210> 16

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 16

ttcgggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg ttacatgtct 60

cgatcccact t

71

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 17

tgcggccgcc gtacggccga gatgtctcgc tccgtggcct ta

42

<210> 18

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(80)

<400> 18

gcggccgccc tacggccgag atg tct cgc tcc gtg gcc tta gct gtg ctc gcg 53

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala

1

5

10

cta ctc tct ctt tct ggc ctg gag gct

80

Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala

15

20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 19

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser

1

5

10

15

Gly Leu Glu Ala

20

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(30)

<400> 20

aga tat cca ctg acc ttt gga tgg tgc ttc

30

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1

5

10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 21

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1

5

10

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 22

aga tac cta agg gat caa cag ctc cta ggg att

33

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile

1

5

10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 23

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile

1

5

10

<210> 24

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

<400> 24

gga ggt ggc ggg tcc gga ggt ggt tct ggt gga ggt tcg atc cag cgt 48

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg

1

5

10

15

act cca aag att

60

Thr Pro Lys Ile

20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg

1

5

10

15

Thr Pro Lys Ile

20

<210> 26

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 26

aag tgg gat cga gac atg taacgtacgc cgtagtaaga aaaacttagg 48

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1 5

gtgaaagttc atcgcggccg c 69

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 27

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1 5

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 28

tgcggccgcc gtacgccgag gatggccgtc atggcgcccc g

41

<210> 29

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 29

ttgcggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg tcacacttta 60

caagctgtga g

71

<210> 30

<211> 38

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(38)

<400> 30

gcggccgccg tacgccgagg atg gcc gtc atg gcg ccc

38

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 31

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 32

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 32

ctc aca gct tgt aaa gtg tgacgtacgc cgtagtaaga aaaacttagg 48

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

gtgaaagttc atcgcggccg c 69

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 33

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

<210> 34

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 34

tgcggccgca gtaagaaaaa cttaggggtca aacgtacggc cgagatgtcg tgggccctgg 60

aaat

64

<210> 35

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 35

ttgcggccgc tatcaatggt ggtgatggtg gtgagctcca cgggttaccg gattac 56

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 36

tgcggccgcc actccttcac tatggatctc ttg

33

<210> 37

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 37

ctacggcgta cgtcaatggt ggtgatggtg gtgagctccg gagccacaac gtcgaat

57

<210> 38

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 38

ttgcggccgc gatgaacttt caccctaagt tttcttact acggcgtacg tca 53

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(60)

<400> 39

gcggccgcag taagaaaaac ttaggggtcaa acgtacggcc gag atg tcg tgg gcc 54

Met Ser Trp Ala

1

ctg gaa

60

Leu Glu

5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 40

Met Ser Trp Ala Leu Glu

1

5

<210> 41

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(42)

<400> 41

cgt aat ccg gta acc cgt gga gct cac cac cat cac cac cat

42

Arg Asn Pro Val Thr Arg Gly Ala His His His His His His

1

5

10

tgatagcggc cgc

55

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 42

Arg Asn Pro Val Thr Arg Gly Ala His His His His His His

1

5

10

<210> 43

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(58)

<400> 43

gcggccgcag taagaaaaac ttaggggtcaa agccttcact atg gat ctc ttg att 55

Met Asp Leu Leu Ile

1 5

cgt

58

Arg

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 44

Met Asp Leu Leu Ile Arg

1 5

<210> 45

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(42)



&lt;400&gt; 45

att cga cgt tgt ggc tcc gga gct cac cac cat cac cac cat 42

Ile Arg Arg Cys Gly Ser Gly Ala His His His His His His

1 5 10

tgatagcggc cgc 55

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 46

Ile Arg Arg Cys Gly Ser Gly Ala His His His His His His

1 5 10

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

エピトープ結合  $\beta 2m$  (e/ $\beta 2m$ ) を発現するSeVベクター製造用プラスミド (e/ $\beta 2m$ /pSeVb) の構造を示す図である。

## 【図 2】

膜結合型HLA A\*2402 を発現するSeVベクター製造用プラスミド (A24full/pSeVb) の構造を示す図である。

## 【図 3】

TAP阻害因子を発現するSeVベクター製造用プラスミドの構造を示す図である。  
ICP47<sub>his</sub>/pSeVcおよびUS6<sub>his</sub>/pSeVcの構造が示されている。

## 【図 4】

エピトープ結合  $\beta 2m$  (e/ $\beta 2m$ ) および TAP 阻害蛋白質 (ICP47<sub>his</sub> または US6<sub>his</sub>) を共発現する SeV ベクターの構造を示す図である。

## 【図 5】

膜発現型 MHC class I/ペプチド複合体の効果を示す図である。H9 細胞 (HLA-A\*2402- ヒト T 細胞株) に A24full/SeVb および e/Nef138- $\beta 2m$ /SeVb をそれぞれ m.o.i.=10 および 2 で感染した。陰性コントロールとして e/Nef138- $\beta 2m$ /SeVb の代わりに wt/SeV を感染したものを用いた。18 時間後 100  $\mu$  Ci の Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> で 2 時間ラベルし Nef138-10 特異的 CTL クローンを用いて <sup>51</sup>Cr 放出アッセイを行った。

## 【図 6】

分泌型エピトープ結合  $\beta 2m$  の効果を示す図である。H9 細胞 (HLA-A\*2402- ヒト T 細胞株) に e/Nef138- $\beta 2m$ /SeVb または対照群として wt/SeV を m.o.i.=2 で重感染させ、3 日後に培養上清を回収し 0.22  $\mu$  m のフィルターを用いて濾過した。

標的細胞として H9 細胞 (HLA-A\*2402- ヒト T 細胞株) に A24full/SeVb および wt/SeV をそれぞれ m.o.i.=10 および 2 で重感染した。SeV 感染後、18 時間経過した標的細胞を 100  $\mu$  Ci の Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> で 2 時間ラベルした。その後、上記のように調製した e/Nef138- $\beta 2m$  を含む培養上清、もしくは陽性コントロールとして 10  $\mu$  M Nef138-10 合成ペプチド、陰性コントロールとして wt/SeV 感染細胞培養上清をパルスした。1 時間後、Nef138-10 特異的 CTL クローンを用いて <sup>51</sup>Cr 放出アッセイを行った。比較として A24full/SeVb および e/Nef138- $\beta 2m$ /SeVb をそれぞれ m.o.i.=10 および 2 で重感染した H9 細胞も同様にアッセイした。

## 【図 7】

TAP 阻害蛋白質を発現する SeV ベクターの導入による細胞表面上の MHC class I/ペプチド複合体の減少を示す図である。ICP<sub>his</sub>/SeVc または US6<sub>his</sub>/SeVc を H9 細胞に m.o.i. 3 で感染させ、18, 24, 30, 42 時間後に細胞を回収し、抗 MHC class I 抗体にて染色し、細胞表面の MHC class I/ペプチド複合体の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。図中の数値は M.F.I. (Mean Fluorescent Intensity、平均蛍光強度) を表す。また、点線はアイソタイプコントロール、実線は野生型 SeV を感染させたものを表す (以下図 8、9、11 も同じ)。TAP 阻害蛋白質の発現に

より、新規のMHC class I/ペプチド複合体の膜表面の発現が阻害され、時間の経過とともにMHC class I/ペプチド複合体が減少した。しかしながら既存のMHC class I/ペプチド複合体には影響をおよぼさないで、減少のレベルは少ない。

【図 8】

既存のMHC class I/ペプチド複合体への酸処理の効果を示す図である。MT-2細胞を酸処理の後 1, 3, 6 時間後に抗MHC class I抗体にて染色し、細胞表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。酸処理により細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体上のペプチドが剥がれ、細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体は減少した。その後 6 時間程度では酸処理前と同程度まで細胞膜上のMHC class I/ペプチド複合体の発現量が回復した。

【図 9】

酸処理およびTAP阻害蛋白質を発現するSeVベクターの導入によるMHC class I/ペプチド複合体の発現の抑制効果を示す図である。MT-2細胞にICPhis/SeVcまたはUS6his/SeVcをm.o.i. 3で感染させ、14時間後に酸処理を行い、その 6 時間後に抗HLA-A24抗体にて染色し、細胞膜表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量をフローサイトメトリーにて解析した。酸処理により既存のMHC class I/ペプチド複合体が除去され、さらにTAP阻害蛋白質によって新規のMHC class I/ペプチド複合体の細胞表面への発現が抑制された結果、酸処理から 6 時間後も細胞表面のMHC class I/ペプチド複合体の発現量は低いままであった。

【図 10】

エピトープ結合  $\beta 2m$  およびTAP阻害蛋白質を共発現するSeVベクターの細胞への導入、細胞内での両蛋白質の発現を示す図である。<e/Nef138- $\beta 2m$ +US6his>/SeV感染細胞においてe/Nef138- $\beta 2m$  およびUS6hisが発現していることが示されている。

【図 11】

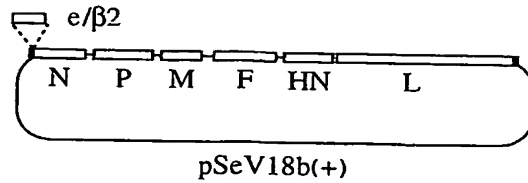
エピトープ結合  $\beta 2m$  およびTAP阻害蛋白質を共発現するSeVベクターの導入によるエピトープ結合  $\beta 2m$  を結合したMHC class I/ペプチド複合体の発現を示した図である。ICPhisまたはUS6hisのみを発現するSeVベクターを用いて導入した細胞では酸処理の 6 時間後も細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体は減少したま

まであるが、e/Nef138- $\beta$ 2mおよびICP47his, またはUS6hisを共発現するSeVベクターを導入した細胞では酸処理の6時間後に酸処理前のレベルまで細胞表面上のMHC class I/ペプチド複合体の発現量が回復していることを示している。

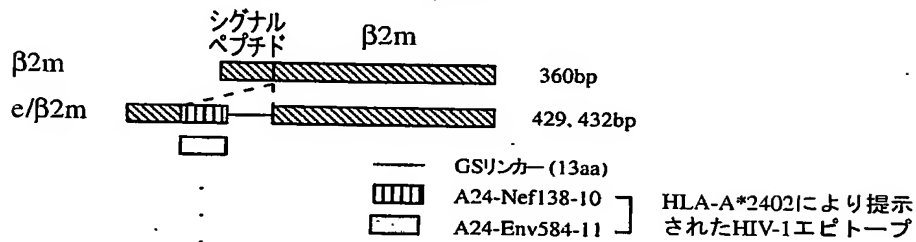
【書類名】 図面

【図 1】

e/β2m/pSeVb の作製



エピトープ結合β2ミクログロブリン (e/β2m)



<Not I>                      <..... β2mシグナル .....>  
 GCGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTCTGGCCTGGAGGCT  
    M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A

<..... HIV-A24Nef138-10 .....>  
 AGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTTC GGA  
 R Y P L T F G W C F G

<..... HIV-A24Env584-11 .....>  
 AGATACCTAAGGGATCAACAGCTCCTAGGGATT  
 R Y L R D Q Q L L G I

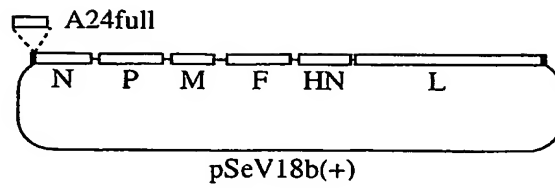
<..... リンカー .....> × <..... β2m .....>  
 GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGTTCTGGTGGAGGTTTCGATCCAGCGTACTCCAAAGATT  
 G G G G S G G G S G G G S I Q R T P K I

(途中略)

..... β2m.....>                      <Eシグナル>    <Sシグナル>    <Not I>  
 AAGTGGGATCGAGACATGTAACGTACGCCGTAGTAAGAAAACTAGGGTAAAGTTCATCGCGGCCGC  
 K W D R D M \*

【図 2】

A24full/pSeVb の作製



<A24full/SeVb>

<- Not I ->

<----- A2402 ----->

GCGGCCGCGGTACGCCGAGGATGGCCGTCATGGCGCCC

M A V M A P

(途中略)

----- A2402 ----->

<Eシグナル>

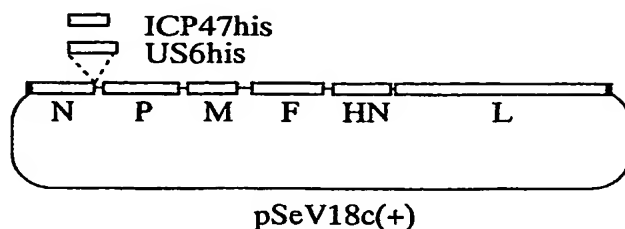
<-Sシグナル->

<- Not I ->

CTCACAGCTTGTAAGTGTGACGTACGCCGTAGTAAGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCATCGCGGCCGC

L T A C K V \*

【図 3】

ICP47 $his$ , US6 $his$ /pSeVcの作製<ICP47  $his$ /pSeVc>

<..Not I -> <Eシグナル> <Sシグナル> <..... ICP47 .....

GCGGCCGCAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAACGTACGGCCGAGATGTCGTGGGCCCTGGAA

M S W A L E

(途中略)

..... ICP47 .....> <..... (His)<sub>6</sub>.....> <..Not I ->

CGTAATCCGGTAACCCGTGGAGCTCACCACCATCACCACCATTGATAGCGGCCGC

R N P V T R G A H H H H H H \*

<US6  $his$ /pSeVc>

<..Not I -> <Eシグナル> <Sシグナル> <..... US6 .....

GCGGCCGCAGTAAGAAAACTTAGGGTCAAAGCCTTCACTATGGATCTCTTGATTTCGT

M D L L I R

(途中略)

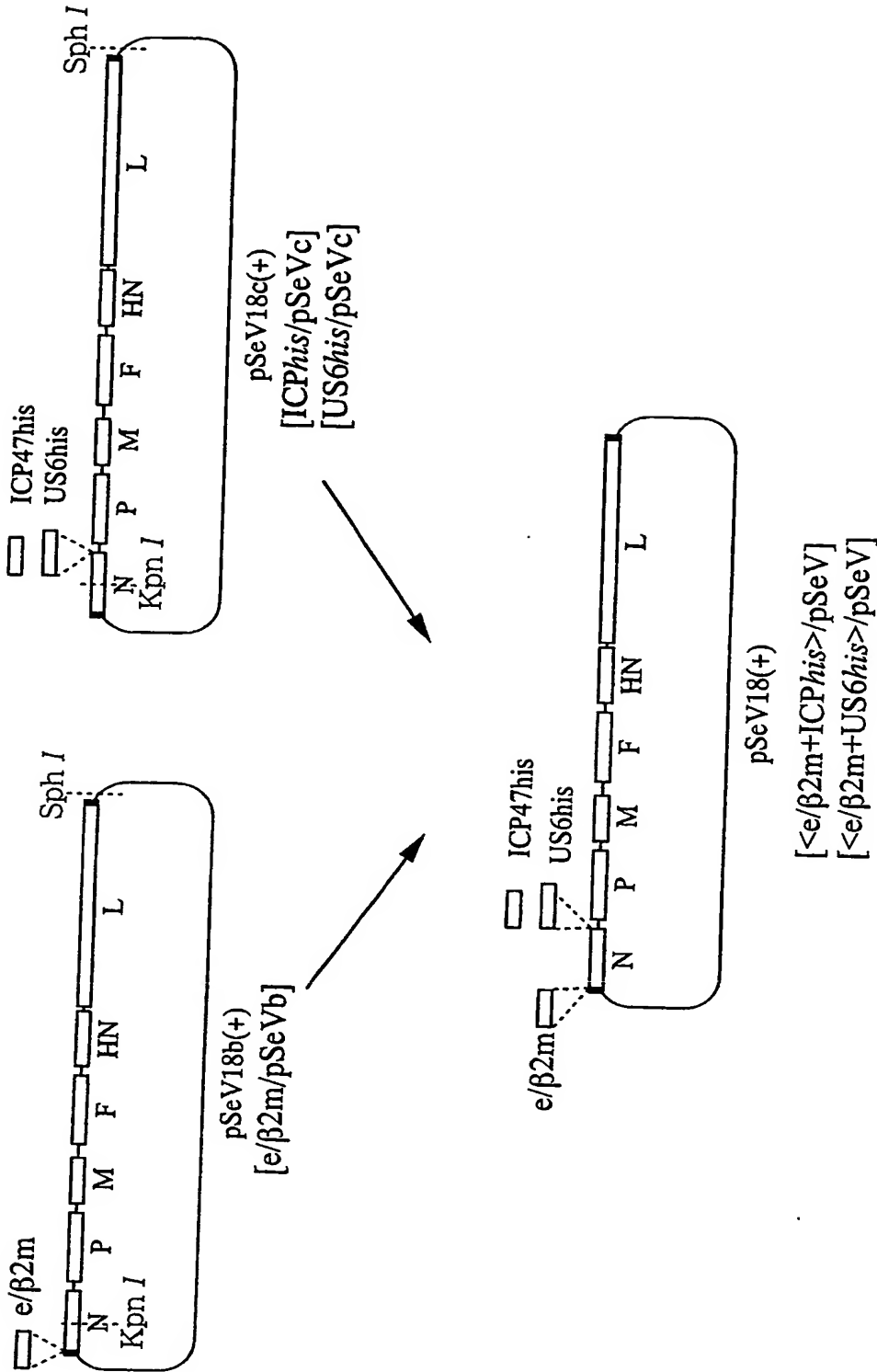
..... US6 .....> <..... (His)<sub>6</sub>.....> <..Not I ->

ATTCGACGTTGTGGCTCCGGAGCTCACCACCATCACCACCATTGATAGCGGCCGC

I R R C G S G A H H H H H H \*

【図 4】

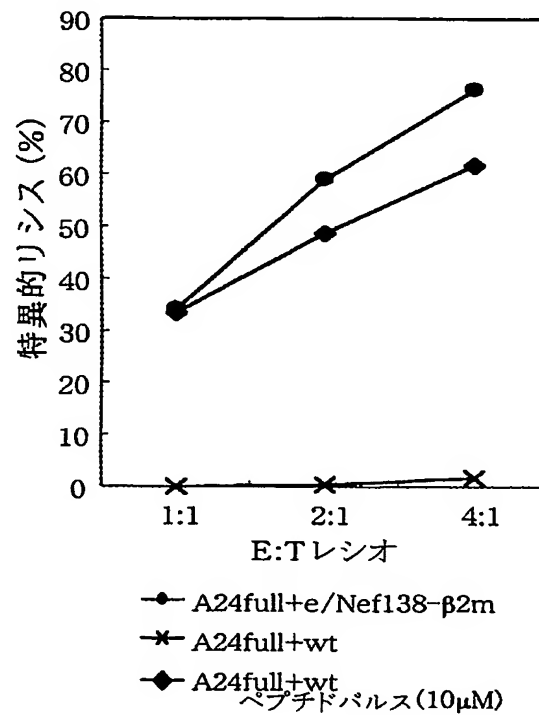
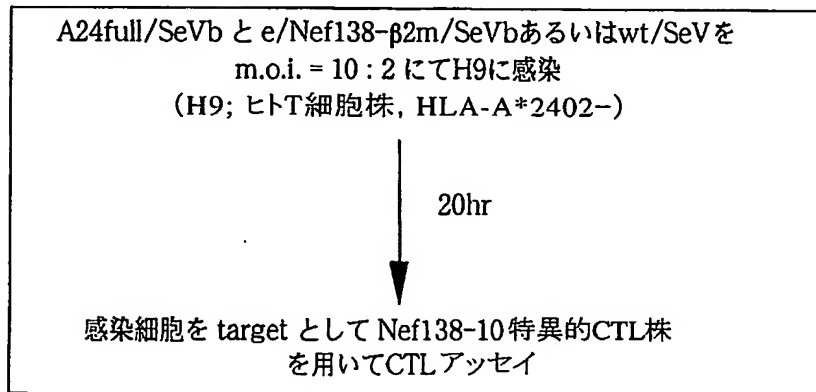
$\langle e/\beta 2m + ICP47his \rangle / pSeV, \langle e/\beta 2m + US6his \rangle / pSeV$  の作製



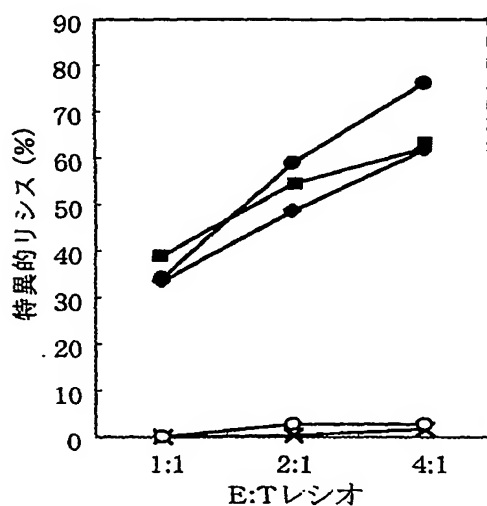
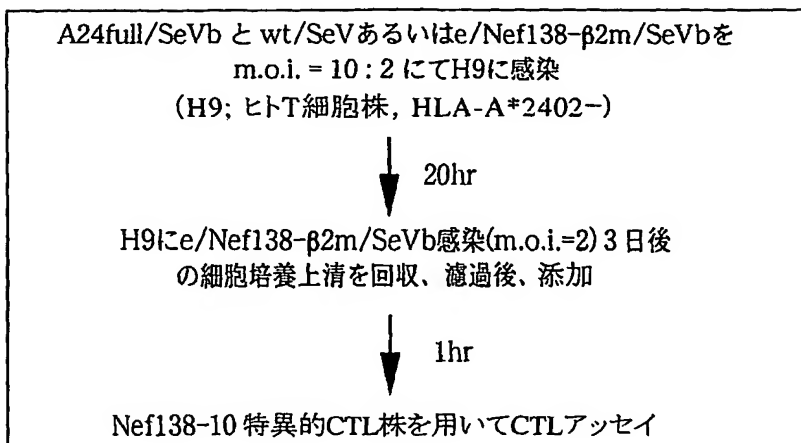


【図 5】

## 膜発現型MHC class I/ペプチド複合体の効果



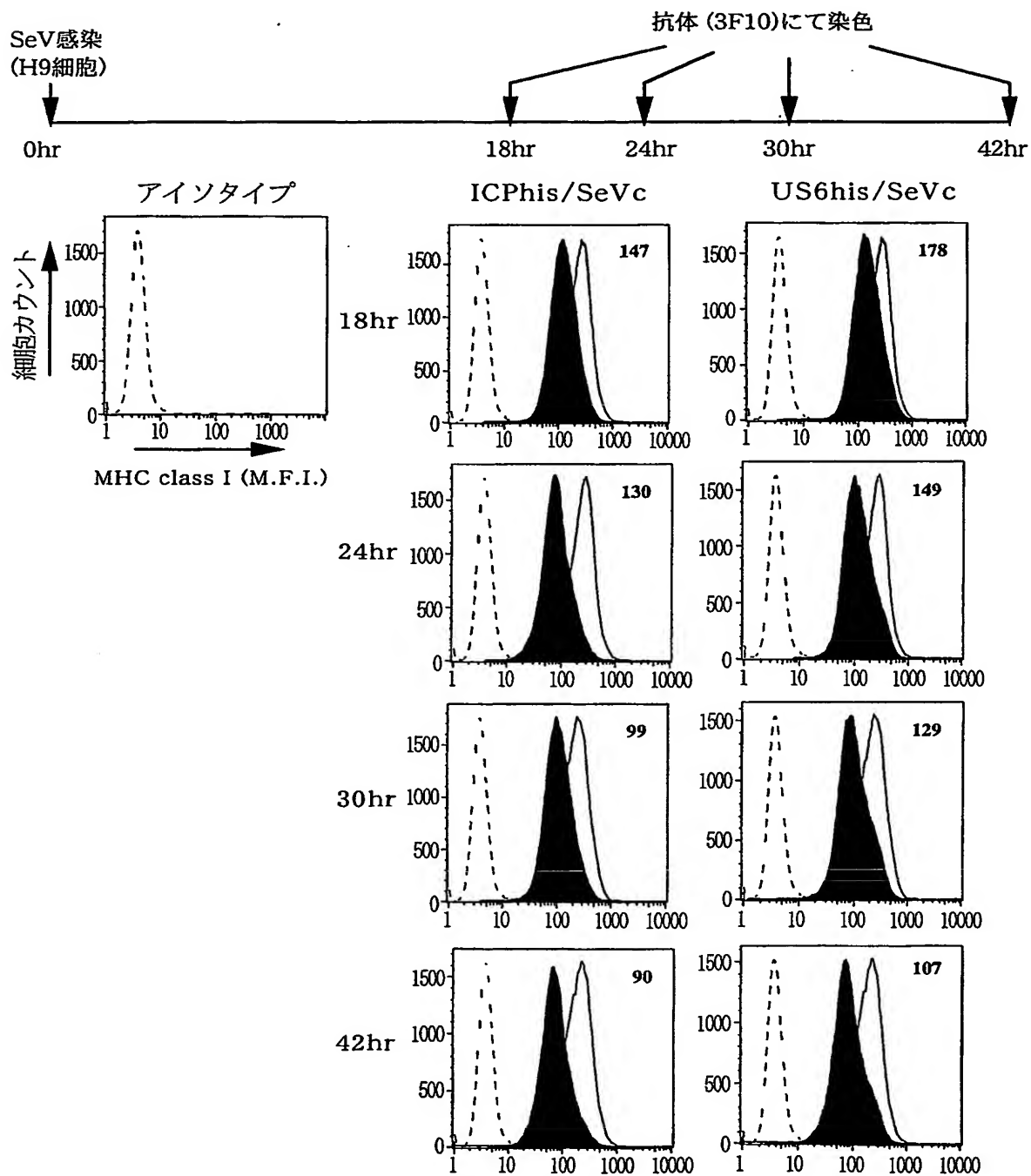
【図6】

エピトープ結合 $\beta$ 2mの効果

SeV感染		可溶性因子
●	A24full e/Nef138- $\beta$ 2m	-
*	A24full wt	-
◆	A24full wt	ペプチド(10 $\mu$ M)
■	A24full wt	e/Nef138- $\beta$ 2m
○	A24full wt	wt

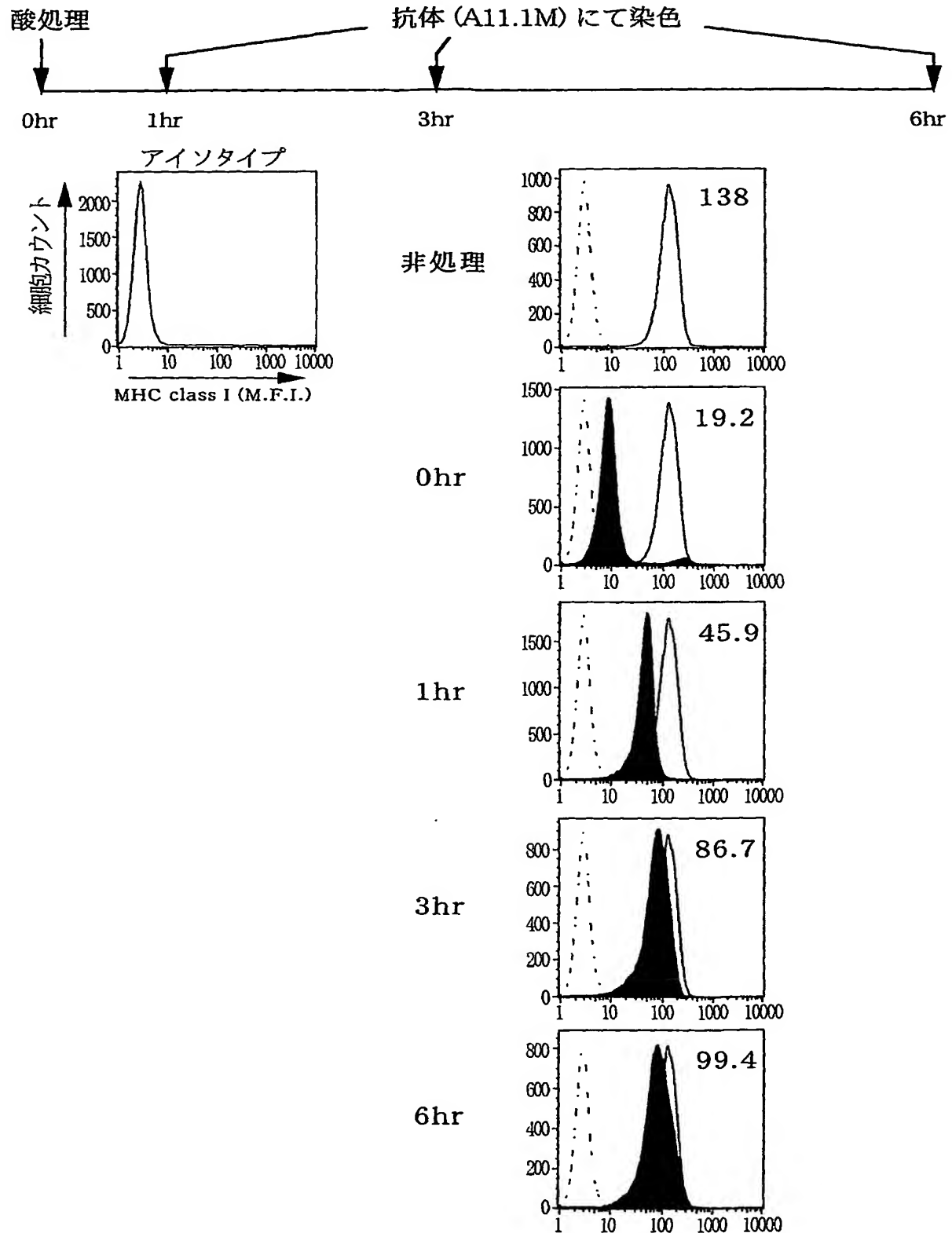
【図 7】

ICP47, US6による細胞表面 MHC class I/ペプチド複合体の減少



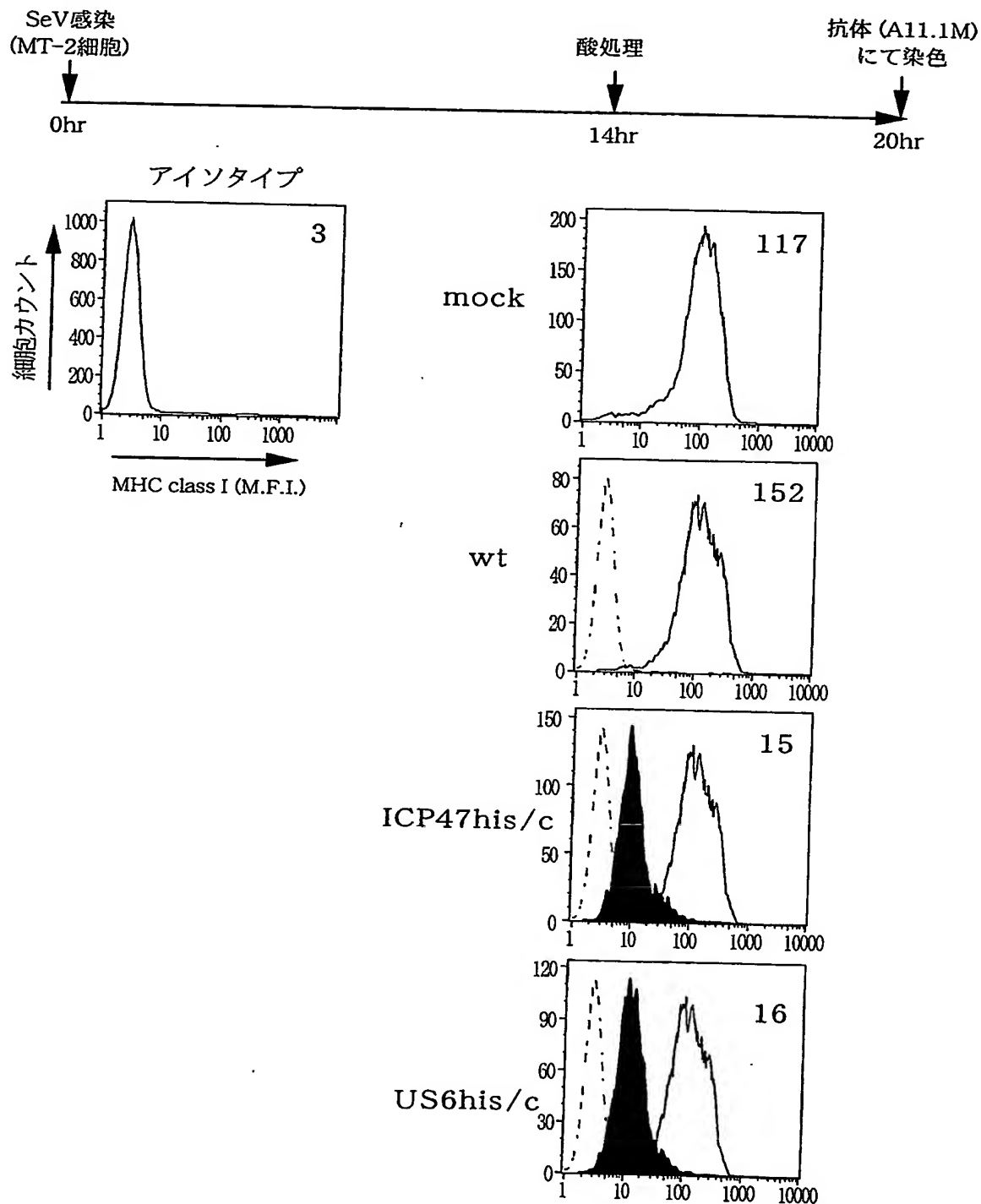
【図 8】

既存のMHC class I/ペプチド複合体への酸処理の効果



【図 9】

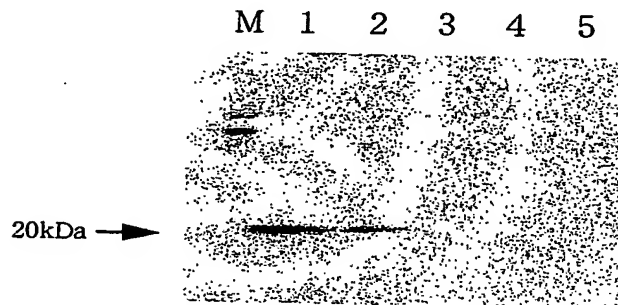
ICP47, US6による酸処理後の細胞表面へのMHC class I/ペプチド複合体の発現抑制



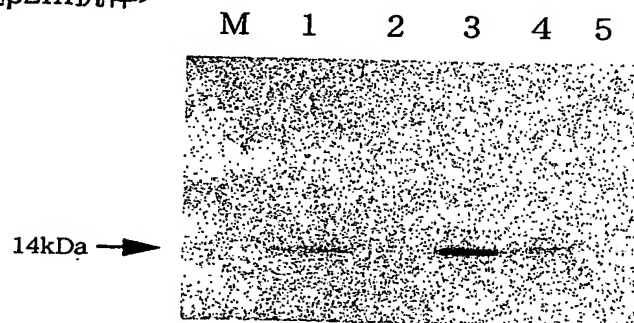
【図10】

<e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/SeVによるe/Nef138- $\beta$ 2mとUS6の共発現

<A. 抗(His)<sub>6</sub>抗体>



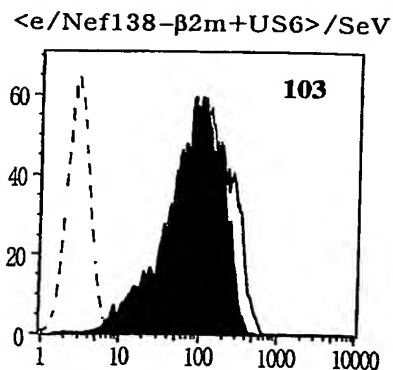
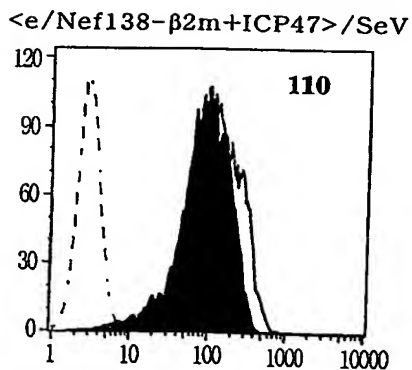
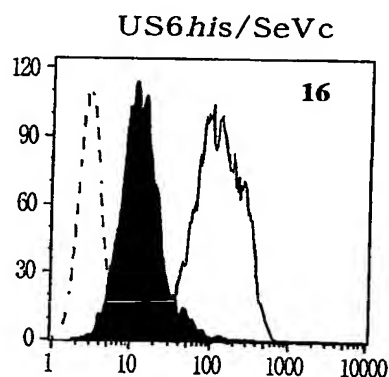
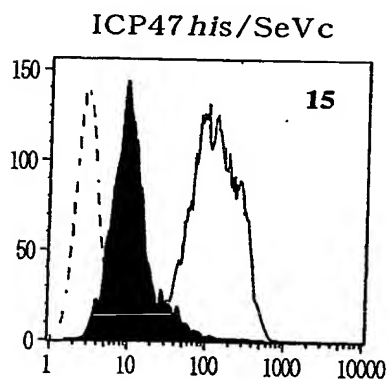
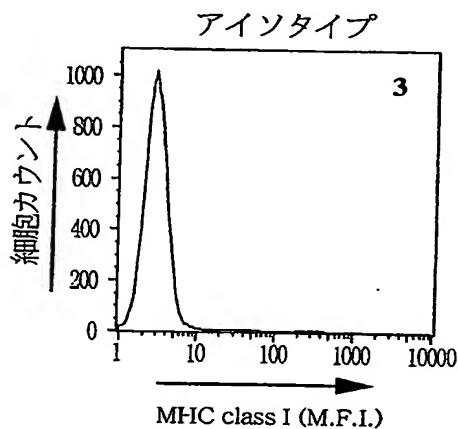
<B. 抗 $\beta$ 2m抗体>



M: サイズマーカー  
lane 1: <e/Nef138- $\beta$ 2m+US6his>/SeV  
lane 2: US6his/SeVc  
lane 3: e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVb  
lane 4: e/Nef138- $\beta$ 2m/SeVc  
lane 5: wt

【図 11】

<e/Nef138- $\beta$ 2m+ICP47his>/SeVまたは<e/nef138-b2m+US6his>SeV  
 による酸処理後のMHC class I/ペプチド複合体の回復



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 TAP活性を阻害することにより MHC class I による外来エピトープの提示を増強する方法を開発した。TAP阻害因子とエピトープ結合  $\beta 2m$  を共にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを構築し、哺乳動物細胞に導入した。TAP阻害因子により内因性のMHC class I/ペプチド複合体を減少させ、ベクターから発現させたエピトープ結合  $\beta 2m$  を含むMHC class I/ペプチド複合体を高頻度に細胞表面に提示させることに成功した。本発明は、感染症や癌などにおけるワクチン療法において有用である。

【選択図】 なし



特願 2002-288394

出願人履歴情報

識別番号

[595155107]

1. 変更年月日

1995年11月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

氏 名

株式会社ダイナベック研究所